

CHARAKTERISIERUNG DES
MENSCHLICHEN BRONCHIALSEKRETINHIBITORS
IN PURULENTEM SPUTUM
ALS KOMPLEX MIT LEUKOZYTENPROTEASEN

Christoph Raffelt

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

AUS DER HALS-, NASEN-, UND OHRENKLINIK

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Charakterisierung des menschlichen Bronchialsekretinhibitors
in purulentem Sputum als Komplex mit Leukozytenproteasen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians Universität
zu München

vorgelegt von

Christoph Raffelt

aus

Ebersbach/Sachsen

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr.K.Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.H.Naumann

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.November 1977



MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

A) Einführung

Zum Begriff der Enzyme
Die Funktion der Proteasen im Körper
Inhibitoren
Inhibitoren der Atemwege

B) Hauptteil

I) Gewinnung und Anreicherung von komplexiertem Bronchialsekretinhibitor

Material und Methoden

- Die Lokalisation von freiem und maskiertem Inhibitor in den Fraktionen der Säulenchromatographie
- Trennung von freiem und komplexgebundenem Inhibitor
- Fraktionierung an DEAE - Cellulose
- Fraktionierung auf Sephadex G 100
- Fraktionierung an CM - Cellulose

II) Gewinnung des Antileukozytenproteinaseserum

Material und Methoden

a) Gewinnung von Leukozytenproteasen

- Azokaseintest
 - Elektrophorese (Theoretische Grundlagen)
 - Apparative Ausrüstung der Disk-Elektrophorese
 - Ansätze mit
 - Gelatine als Substrat
 - Azokasein als Substrat
 - Weitere Ansätze
 - Anfärbung der Gele
 - Hemmansätze
 - Dokumentierung
- Ergebnisse

- ##### b) Versuch der besseren elektrophoretischen Darstellung der Kieferhöhlensekretproteasen
- Ergebnis

- c) Versuch der besseren elektrophoretischen Darstellung von Sputengemischen
 - Ergebnis
- d) Reindarstellungsverfahren für Leukozytenproteasen
 - Azokaseingel
 - Weiteres Verfahren zur Reindarstellung der Proteasen: Membranfilterung
- e) Gewinnung von Antileukozytenproteinaseserum:
Bereitung der Injektionen für Kaninchen
 - Die Blutentnahme bei Kaninchen und Serumgewinnung

C) Ergebnisse und Diskussion

D) LITERATURVERZEICHNIS

Einführung

Gerade in einer Zeit zunehmender Luftverunreinigungen und zunehmendem Kontakt mit einer Vielzahl neuer chemischer Verbindungen (Lösungsmittel, Kunststoffe, Verbrennungsrückstände etc.) ist die Lunge eines der am stärksten beanspruchten Organe des Körpers.

Unter den hieraus resultierenden Erkrankungen dieses Organs nehmen deshalb gerade die unspezifischen chronischen Lungen-erkrankungen (auch CURS = chronical unspezific respiratory syndrom genannt) einen sehr großen Platz ein, da es meist chronische, unvermeidliche Kontakte mit Schadstoffen, auch beruflicher Natur (Silikose, Asbestose, Kohlen-, Steinstaub-, Teerlungen u.a.m.) sind, die zur Lungenschädigung geführt haben.

Oft gehen diese Erkrankungen mit Obstruktionen einher, also mit erhöhtem Widerstand für die Luftzirkulation in den Atemwegen, die zugleich meist eine Minderbelüftung verschiedener Lungenbezirke zur Folge haben. Als weitere Komplikationen können sich dann an diesen Stellen durch verminderte Widerstandskraft des Gewebes oder durch Autolyse noch bakterielle und andere Infektionen aufpfropfen, die dann oft das Schicksal eines solchen Kranken besiegeln.

Eine Abwehr des Körpers besteht in der Bildung der entzündlichen Reaktion und im Einwandern von Makrophagen, die aber, in zu großer Zahl, nicht nur die Bakterien, sondern auch das körpereigene Gewebe zerstören können. Als wichtiges Symptom stellt sich dann die Eiterbildung ein.

Eine nicht unwesentliche Rolle spielen hierbei proteolytische Enzyme.

Zum Begriff der Enzyme

Unter Enzymen oder Fermenten versteht man Stoffe, die als Katalysatoren über Zwischenverbindungen chemische Reaktionen beschleunigen oder praktisch erst möglich machen. Sie ermöglichen erst durch ihre Anwesenheit den Stoffwechsel der lebenden Zelle.

Chemisch gehören alle bisher bekannten Enzyme zu den Proteinen oder Proteiden. Die von Enzymen umgesetzten Stoffe nennt man Substrate. Die Substratspezifität eines Enzyms liegt in dem Proteinanteil desselben. Dieser Proteinanteil entscheidet auch, welche von verschiedenen Möglichkeiten einer Reaktion das Substratmolekül eingeht. Man spricht dann von der Wirkungsspezifität des Enzyms (15). Gehört ein Enzym der Gruppe der Proteide an, besteht es aus einem Proteinanteil und der hinzukommenden prosthetischen Gruppe. Ist die Bindung dieser beiden Anteile reversibel, so spricht man von Apoenzym und Coenzym. Reagiert ein Enzym mit einem Substrat, so geht es nach heutiger Vorstellung mit einem "aktiven Zentrum" eine vorübergehende Bindung mit einem Substratanteil ein, wobei die räumliche Konformation und die Ladungen über die Wirkung und Bindung entscheiden.

Für eine optimale Enzymaktivität sind verschiedene Bedingungen notwendig: Das sind die Sättigung mit Substrat, damit jedes freiwerdende Enzym die Chance hat, sich möglichst schnell mit einem neuen Substratmolekül zu verbinden, sowie das für jedes Enzym spezifische pH-Optimum, also das Milieu, in dem das Enzym am aktivsten ist, und schließlich noch das Vorhandensein von Aktivatoren.

Für die Hemmung eines Enzyms besteht die Möglichkeit, einen der oben genannten Parameter zu ändern, was bei extremen pH-Änderungen eine Denaturierung des Enzyms bedeuten würde, oder das aktive Zentrum (auch reversibel) zu blockieren. Stoffe, die das bewirken, nennt man Inhibitoren, die ein Enzym hemmen oder auch "vergiften".

Von den verschiedenen Enzymen haben für uns die eiweißspaltenden Enzyme Bedeutung. Sie gehören zur Obergruppe der Hydrolasen, also zu den hydrolytisch d.h. unter Wassereinführung spaltenden Enzymen. Sie gehören zu den für den Organismus wichtigsten und auch am längsten bekannten Enzymen. Man teilt die eiweißspaltenden oder proteolytischen Enzyme ihrer Funktion nach in Endopeptidasen und Exopeptidasen ein. Die Exopeptidasen spalten nur vom Ende einer Peptidkette her und zwar entweder vom Carboxylende her (Carboxypeptidasen), oder vom Aminoende

her (Aminopeptidasen). Die Endopeptidasen spalten Proteine nicht vom Kettenende her, sondern an bestimmten Verbindungsstellen in der Mitte der Kette. Da sie aufgrund dieser Eigenschaft vorwiegend auf Proteine und höhere Polypeptide wirken, heißen sie auch Proteinasen oder Proteasen. Ihre bekanntesten Vertreter sind die Verdauungsfermente Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin.

Die Funktion der Proteasen im Körper

Über die wichtige Funktion, die die Proteasen physiologisch bei der Verdauung und dem ständigen Eiweißumbau im Körper haben, wurde oben bereits gesprochen.

Andererseits besitzen auch eine Reihe von Infektionserregern Proteasen. So schützen sich Staphylokokken mit einem Fibrinwall, den sie mit einer bestimmten Koagulase erzeugen.

Zum anderen können Pneumo-, Strepto-, und Staphylokokken ihre eigene Ausbreitung im Körper durch die Produktion von Hyaluronidase fördern. Ähnlich reagiert auch die Streptokinase der Streptokokken sowie andere Enzyme, mit denen Krankheitserreger sogar Erythrozyten, möglicherweise auch Leukozyten und Gewebezellen auflösen können. Ein klinisch besonders problematischer Keim ist *Pseudomonas aeruginosa*, der, neben Gewebeeinschmelzung, durch den Farbstoff Pyozyanin blaugrünen Eiter hervorruft und relativ resistent ist (33).

Dieses Bakterium stellt äußerst aktive Proteasen her, die sich deshalb auch in der Disk-Elektrophorese (s.später) besonders gut darstellen lassen. Andererseits stellen gerade bei diesem Keim die oft ausgedehnten Gewebsdefekte den Arzt vor ziemlich große Probleme.

Schließlich werden aber nicht nur bei pathologischen Erregern Proteasen frei, sondern der Körper verfügt auch selbst über Proteasen, die wohl zur Auflösung von Bakterien verwendet werden. Daher lassen sich besonders aus Zellen der Keimabwehr, also aus Leukozyten, ebenfalls Proteasen gewinnen und darstellen (s.später).

Inhibitoren

Um einerseits die proteasenbedingte Gewebseinschmelzung pathogener Keime in Grenzen zu halten, andererseits auch um die Wirkung der eigenen Proteasen zu steuern und um sich vor Autolyse in größerem Ausmaß zu schützen, besitzt der Körper Proteaseninhibitoren mit bestimmten Hemmspektren, die bestimmte Proteasen zu hemmen im Stande sind.

Neben körpereigenen Inhibitoren kennt man heute eine Reihe pflanzlicher Inhibitoren, denen man eine dem Körper entsprechende physiologische Bedeutung zumißt.(32), die also als Schutz gegen Proteasen symbiontischer Bakterien dienen. Neben Untersuchungen der Hemmspektren (4) ist es von Interesse, die Einsatzmöglichkeiten pflanzlicher Inhibitoren als Medikament dem Menschen nutzbar zu machen.

Unter natürlichen Proteinaseinhibitoren versteht man die pflanzlichen, tierischen und menschlichen Inhibitoren. Es handelt sich bei ihnen um säure-, und thermostabile bzw.säurelabile Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 6000 und 12 000 bzw. 20 000 und 820 000. Was das Hemmspektrum betrifft, gibt es monovalente Inhibitoren und polyvalente, also mehrere Enzyme hemmende Inhibitoren.(32)

Inhibitoren der Atemwege

Im Grunde machen Mensch und Tier schon immer von der Tatsache Gebrauch, daß Sekrete wie z.B. Speichel für Proteasen inhibitorisch wirken. Fast instinktiv lecken beispielsweise Tiere, aber bei kleinen Wunden am Finger auch Menschen ihre Wunden ab, und der Volksmund schreibt diesem Verhalten heilungsfördernde Wirkung zu. Tatsächlich enthalten Speichel und Sekrete des Respirationstraktes erhebliche Mengen inhibitorisch aktiven Materials.

Zunächst wußte man, daß ein Teil der antitryptischen Wirkung der Sekrete der oberen Luftwege auf die Wirkung des humoralen Proteaseninhibitors Alpha-1-Antitrypsin zurückzuführen ist.

REICHERT, HOCHSTRASSER und WERLE gelang dann der Nachweis eines schleimhautspezifischen niedermolekularen Proteaseninhibitors in menschlichem Bronchialsekret (26).

Es stellte sich bei diesen Arbeiten heraus, daß die inhibitorische Wirkung dieser Sekrete nur zu etwa 20% auf das Alpha-1-Antitrypsin, und zu 80% auf den schleimhautspezifischen Inhibitor zurückzuführen ist. Dieser Inhibitor hat ferner die Eigenschaft, säurestabil zu sein, d.h. er ist in einer Endkonzentration von 5% Perchlorsäure nicht zu zerstören.

Analog diesem Bronchialsekretinhibitor konnte ein niedermolekularer Inhibitor in menschlichem Nasensekret nachgewiesen werden (6).

Es handelte sich hierbei um einen sog. Lysininhibitor mit definiertem Hemmspektrum: Der native Inhibitor vermag entweder 2 Moleküle Chymotrypsin oder 1 Molekül Trypsin zu binden, außerdem teilweise das Enzym Pronase zu hemmen. Aus anderen Untersuchungen über den Inhibitorspiegel des Nasensekrets läßt sich schließen, daß bei verschiedenen Rhinopathien die inhibitorische Aktivität des Nasensekrets vom Funktionszustand der Nasenschleimhaut abhängig ist (6).

Die Inhibitoren des oberen Respirationstraktes setzen sich also aus zwei Arten zusammen: Zum einen aus Inhibitoren, die aus dem Blutserum stammen und vermutlich in die Schleimhaut oder in die Sekrete aus dem Blut ausdiffundieren. Zu diesen Inhibitoren zählen Alpha-1-Antitrypsin und Alpha-1-Antichymotrypsin (30, 24).

Zum anderen gibt es zwei nahe verwandte spezifische Proteaseninhibitoren, die nur in den Schleimhautsekreten des oberen Respirationstraktes vorkommen und die säurestabil sind. (6, 5, 7). Der größere Teil des Hemmpools ist mit 70-80% auf diese schleimhautspezifischen Inhibitoren zurückzuführen.

Es wurde auch nachgewiesen, daß die säurestabilen Inhibitoren und auch Alpha-1-Antitrypsin in Bronchialsekreten bei entzündlichen Vorgängen auch in maskierter Form, d.h. an proteolytische Enzyme gebunden vorkommen können. (27, 8). Es kommt im Entzündungsablauf zur Freisetzung von Proteasen, z.B. aus zerfallenden Makrophagen, die durch die Inhibitoren inaktiviert werden. Der Prozentanteil von maskiertem Inhibitor an der

Gesamtmenge vorhandener Inhibitoren kann deshalb als Maß für die Stärke ablaufender Entzündungen gewertet werden.

(27). Untermauert wurden diese Beobachtungen noch, als man bei massivem Leukozytenaustritt proteolytische Aktivität nachweisen konnte, wobei in diesen Fällen das inhibierende System völlig überspielt war. Biochemisch noch aktive Inhibitoren waren dann nicht mehr nachweisbar (9).

Bei Untersuchungen an Sputen ergab sich, daß aber auch gleichzeitig proteolytische und antiproteolytische Aktivität vorkommen kann (25). Aus den unterschiedlichen Molekulargewichten der Inhibitoren, der Inhibitor-Proteasenkompexe und der freien Proteasen ließ sich schließen, daß in diesen Sputen zumindest zwei Arten von Proteasen vorkommen müßten, von denen nur eine Art durch die natürlichen Inhibitoren gehemmt wird (10).

Auch bei den Sputen überwiegt bei der antiproteolytischen Aktivität der schleimhautspezifische Inhibitor gegenüber humoralen Inhibitoren. Bei chronischen, langjährigen Erkrankungen scheinen in den Sputen proteolytische Enzyme vielleicht bakterieller Herkunft oder Gewebsproteasen zu überwiegen, die vom natürlichen Schleimhautinhibitor nicht gehemmt werden können. Nach heutigem Wissensstand scheinen als Folge der gesteigerten Proteolyse Obstruktionen gefördert zu werden.(11).

Die fördernde Wirkung freier Proteasen auf Obstruktionen wurde erstmals von LAURELL und ERIKSON (16,17) festgestellt, als sie beobachteten, daß bei erblichem Alpha-1-Antitrypsinmangel gehäuft Lungenemphyseme auftreten. Seit diesen Beobachtungen wurde in der Literatur von weiteren über 100 Patienten berichtet, bei denen der Blutserumgehalt an Alpha-1-Antitrypsin auf 10% des Normalspiegels erniedrigt war. Bei diesen Patienten ist mit hoher Wahrscheinlichkeit damit zu rechnen, daß sie ab dem 4. Lebensjahrzehnt ein chronisch obstruktives Lungenemphysem bekommen werden. Alpha-1-Antitrypsin, das bei diesen Patienten auf Grund eines homozygoten Gendefektes erniedrigt ist, (auch bei heterozygoten Merkmalsträgern wurde eine erhöhte Anfälligkeit für bronchopulmonale Affektionen beschrieben (1,20)), gehört zu den polyvalenten Proteaseninhibitoren, da es neben Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Plasmin auch leukozytäre Proteasen zu hemmen vermag (28).

Neben Leber und Milz scheint der Lunge eine gewisse Speicherfunktion für Leukozyten zuzukommen (28), wodurch im Falle einer Infektion die Möglichkeit besonders erhöhten Leukozytenzerfalls mit entsprechend erhöhten freiwerdenden Proteasemengen wahrscheinlich wird. Ist nun der Hemmstoffgehalt des Blutserums vermindert, so können diese Proteasen nicht mehr ausreichend inhibiert werden, und das Lungengewebe kann angedaut werden. Nicht einheitlich beantwortet wird die Frage, ob bei den Folgen dieser Andauung der bronchitische Prozess oder mehr das Emphysem im Vordergrund stehen.

Mit dem Alpha-1-Antitrypsinmangel steigt die Bedeutung des niedermolekularen Schleimhautinhibitors, zumal er auch bei Gesunden den größeren Anteil an inhibitorischer Aktivität hat. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Inhibitor (Molekulargewicht 14 000) neben Trypsin, Chymotrypsin und Pronase auch leukozytäre Proteasen hemmt (9). Das inhibierende System der Lunge wird also tatsächlich in Anspruch genommen, denn bereits in physiol. Sekreten liegt sowohl der humorale Inhibitor Alpha-1-Antitrypsin als auch der schleimhautspezifische Inhibitor des Flimmerepithels teilweise in maskierter, gebundener Form vor (27,8). Dies läßt sich im Falle des Alpha-1-Antitrypsins durch zweidimensionale Immunelektrophorese nachweisen. Der komplexierte Inhibitor stellt sich dann als ein zweiter Präzipitationsgipfel dar. Der maskierte niedermolekulare Inhibitor kann durch Säurefällung des Komplexpartners (s.später) freigesetzt und bestimmt werden.

Für uns war nun die Frage von Interesse, welche Proteasen in vivo in Wechselwirkung mit Inhibitoren treten. Hierzu war es erforderlich, zunächst die Komplexverbindungen des schleimhautspezifischen Inhibitors zu isolieren und zu charakterisieren.

Gewinnung und Anreicherung von komplexiertem Bronchialsekretinhibitor

Material und Methoden

Das Ausgangsmaterial für die Isolierung der Komplexe war lyophilisiertes Sammel Sputum von verschiedenen Patienten mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen.

Anti-inter-alpha-trypsininhibitorserum vom Kaninchen, Behringwerke Marburg.

Anti-bronchialsekretinhibitorserum vom Kaninchen, Spezialanfertigung mit Antigen unseres Labors durch Behringwerke Marburg¹⁾

Antileukozytenproteinaseserum, Laborpräparat: Die Gewinnung und Herstellung des Serums ist Teil dieser Arbeit (siehe später).

Die Lokalisierung von freiem und maskiertem Inhibitor in den Fraktionen der Säulenchromatographie

Purulenten Sputum enthält nicht nur maskierten, sondern auch freien niedermolekularen Inhibitor. (10). Der freie Inhibitor läßt sich durch den kinetischen Trypsinhemmtest nachweisen (2) Unter einer Inhibitormilliunit (mIU) versteht man demnach diejenige Inhibitormenge, die eine Trypsinmilliunit (mU) hemmt. Wir nannten den Test nach dem Substrat BAPA-Test. Das verwendete Substrat Benzoyl-arginin-4-nitroanilid wird von Trypsin gespalten, so daß der gelbe 4-nitroanilid-rest durch seine variierende Lichttransmission als Indikator im Photometer dienen kann. So bewirkt 1mU Trypsin in dem von uns verwendeten Standardansatz mit BAPA als Substrat eine Extinktionszunahme von $E = 0,0033$ pro Minute und bei 25°C.

Die Verminderung der Extinktionszunahme im Standardansatz bei Zugabe inhibitorhaltigen Materials um diesen Betrag zeigt eine mIU an.

Ansätze:

10 mU Trypsin (bei dem von uns verwendeten Trypsinpräparat etwa 12 μ g) werden in 0,2 ml 0,0025 N HCl gelöst.

Bei der von uns verwendeten Lösung hieß das: 15 mg Trypsin wurden in 200 ml verdünnter Salzsäure (1,25 ml 2 N HCl/ 11 Aqua dest.) gelöst.

0,2 M Triäthanolamin-HCl Puffer pH = 7,8

0,5 ml Hemmstofflösung

¹⁾ Herrn Dr. Heimbürger, Behringwerke Marburg sind wir für die Anfertigung des Antiserums zu großem Dank verpflichtet.

1 ml Substrat gelöst in Wasser, Endkonzentration $73 \mu\text{mol/l}$. Gemessen wurde bei 405 nm .

Die Extinktionsdifferenz der ungehemmten Reaktion war $0,033$ pro Minute bei 25° C .

Zur Prüfung der Fraktionen wurden aliquote Teile aus den Gläschen des Fraktomaten entnommen, mit 70% Perchlorsäure versetzt (Endkonzentration 3%), zentrifugiert und der Überstand mit 6 N NaOH genau neutralisiert. Die so vorbereiteten Proben konnten nun zum Hemmtest verwendet werden.

Unser Ansatz in den Cuvetten sah also folgendermaßen aus: Trypsinstandart + Hemmstofflösung wurden mit TRA-Puffer auf 2 ml ergänzt. Die kinetische Reaktion startete dann durch Zugabe von 1ml BAPA.

z.B.: $200 \mu\text{l}$ Trypsinstandartlösung
 $500 \mu\text{l}$ Substanz gelöst (Inhibitor)
1,3 ml TRA-Puffer

+1,0 ml BAPA, dann schnell umrühren und mit der Stoppuhr im Photometer jede Minute die entsprechende Extinktion bestimmt und notiert. Nach 3-4 Extinktionswerten wurde jeweils die Differenz gebildet und, um eventuelle Ablesefehler zu vermeiden, unwahrscheinliche Werte eliminiert und die übrigen Werte gemittelt.

Trennung von freiem und komplexgebundenen Inhibitor

Es wurde zunächst lyophilisiertes Sputum (200 mg, seröse Phase) in 50 ml 0,05 M Boratpuffer $\text{pH} = 7,5$, enthaltend 0,1 M NaCl gelöst.

Da das Sputum in gelöster Form zunächst schleimige Konsistenz annimmt, ist es notwendig, dasselbe mit dem Spatel im Glas öfters zu zerreiben und etwa 15 min. mit einem "Fischchen" auf dem Rührer kräftig zu rühren. Reste, die dann noch unlöslich waren, wurden in der Ultrazentrifuge bei 18 000 Upm 20 min. lang zentrifugiert, so daß sich Verunreinigungen unlöslicher Art in relativ fester Form absetzten.

Der Überstand wurde dann auf eine Säule ($2,5 \times 150 \text{ cm}$) mit Sephadex G 75 aufgetragen und mit obigem Puffer fraktioniert.

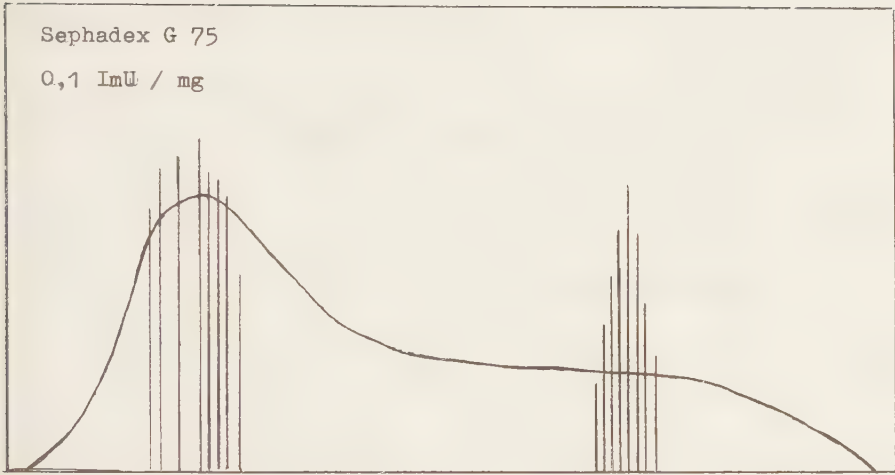


Abb.1a

Freier aktiver Inhibitor findet sich im Elutionsbereich für Substanzen mit einem Molekulargewicht um 14 000 (s.Abb.1a). Eine geringe Hemmbarkeit findet sich dann in einem Elutionsvolumen, das der Anschlußgrenze entspricht. Man kann hier alpha-1-Antitrypsin immunologisch nachweisen. Deproteinisiert man aliquote Teile aus diesen Fraktionen, so steigt die antiproteolytische Aktivität an, obwohl bei diesem Vorgehen alpha-1-Antitrypsin entfernt wird.

Bei der Rechromatographie dieser freigesetzten antiproteolytischen Aktivität erscheint das Material im Eluat an der gleichen Stelle wie der freie Inhibitor. (s.Abb.1b)

Das mit der Front eluierbare Material enthält demnach offensichtlich neben alpha-1-Antitrypsin den an ein höhermolekulares Protein gebundenen maskierten schleimhautspezifischen Inhibitor. Mit der bisher beschriebenen Methode wurde der Komplexgebundene Inhibitor aus insgesamt 10 g Trockensputum vom freien Inhibitor getrennt. Die komplexhaltigen Fraktionen wurden nun vereinigt, dialysiert und gefriergetrocknet.

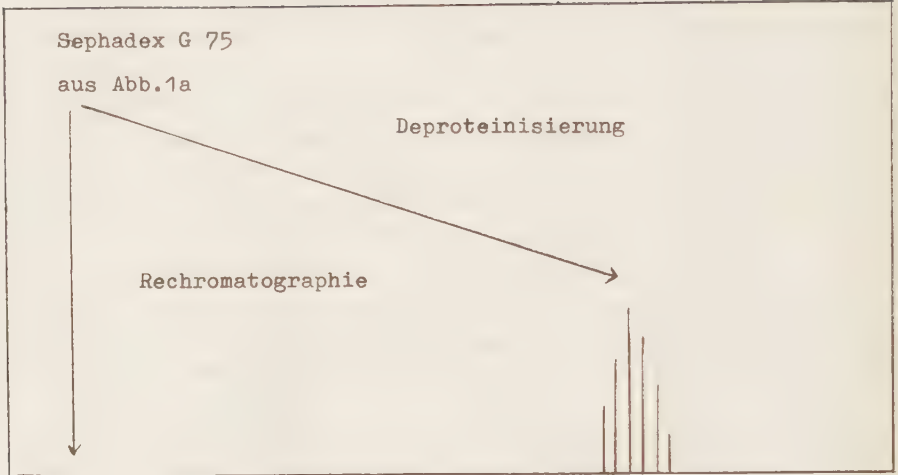


Abb.1b

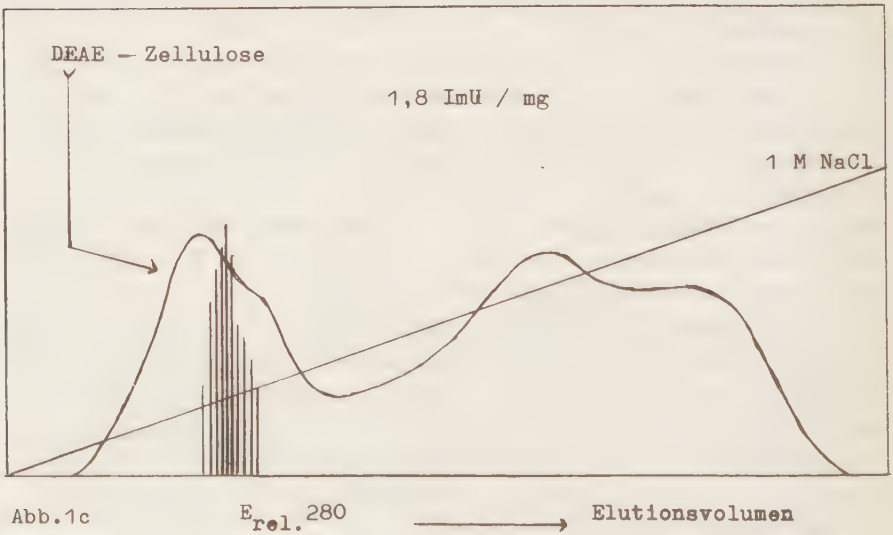


Abb.1c

Fraktionierung an DEAE - Cellulose

500 mg des in den Fraktionen auf Sephadex G 75 (s.vorhergehendes Kapitel) gewonnen Materials wurden in 100 ml 0,05 M Boratpuffer pH = 7,5 gelöst. Das gelöste Material wurde nun auf eine Säule (3 x 30 cm), enthaltend DEAE-Cellulose im gleichen Puffer aufgetragen. Freier Inhibitor ist unter diesen Bedingungen im Eluat nicht nachweisbar; (bei pH - Werten unter 7 wird der Inhibitor-Komplex durch den Austauscher zerlegt in freien Inhibitor und Proteasen.)

Maskierter Inhibitor, also der Komplex, wird mit den ersten proteinhaltigen Fraktionen eluiert. Nachweisbar ist der maskierte Inhibitor erst nach Deproteinisierung, z.B. durch Säurefällung der höhermolekularen Proteasen. Das Material wird aus den Komplexhaltigen Fraktionen wie bei Sephadex G 75 gewonnen.

Fraktionierung auf Sephadex G 100

Das aus der Fraktionierung an DEAE - Cellulose gewonnene Material wird nun über eine Säule wie bei Sephadex G 75 (2,5 x 150 cm) und unter denselben Pufferbedingungen chromatographiert. Mit diesem Verfahren ist es möglich, hochmolekulare Substanzen abzutrennen und den Komplex somit um einen weiteren Schritt anzureichern und zu reinigen. Der maskierte Inhibitor wird dann als Doppelgipfel eluiert (s. Abb. 1d)

Fraktionierung an CM - Cellulose

200 mg des aus dem letzten verfahren (Sephadex G 100) gewonnen Materials (es war zum abwiegen zuvor lyophilisiert worden) werden nun in 50 ml 0,05 M Boratpuffer pH 7,2 gelöst und auf einer Säule (3 x 30 cm), gefüllt mit CM-Cellulose im gleichen Puffer aufgetragen. Das Material wurde nun mit einem linearen NaCl Gradienten (1 M) fraktioniert.

Der komplexierte Inhibitor wird dann bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,4 M eluiert. Die komplexhaltigen Fraktionen wurden wie im Kapitel mit Sephadex G 75 gewonnen. (s. Abb. 1e)

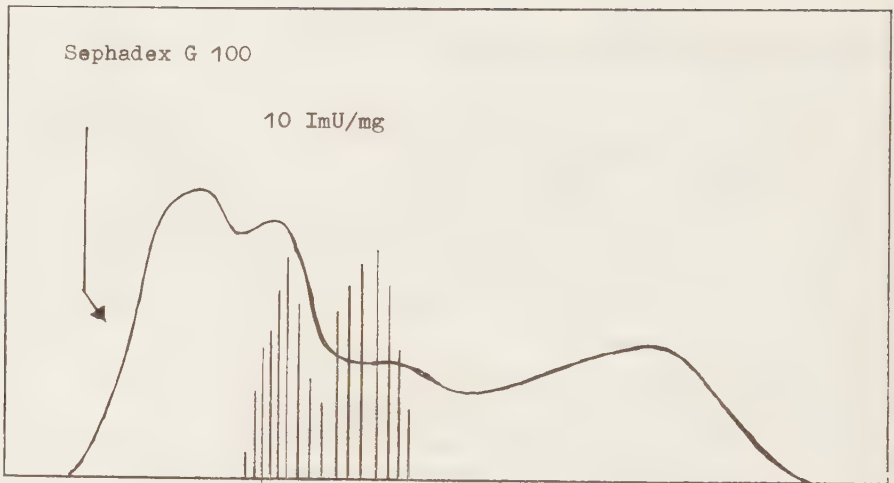
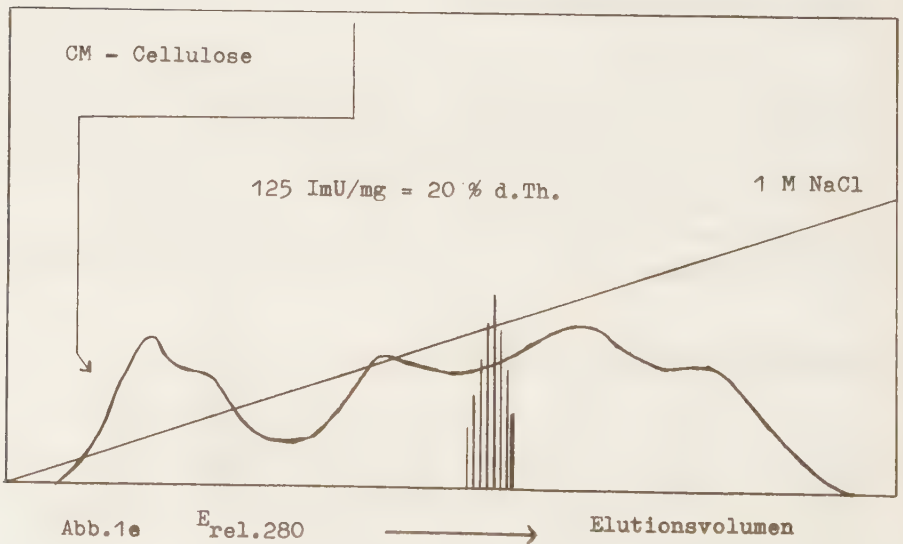


Abb.1d



Abbildungen 1 a-e stellen die Chromatographieschritte zur Anreicherung von komplexgebundenem Bronchialsekretinhibitor schematisch dar.

Gewinnung des Antileukozytenproteinaseserum

Material und Methoden

Nach LAZARUS et al. (18), die eine spezifische Kollagenase aus menschlichen Granulozyten teilweise rein extrahieren konnten, gelang es OHLSSON (22,23) und JANOFF (14), aus menschlichen Leukozyten Proteinase zu isolieren. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um 3 Isoenzyme mit elastolytischer Aktivität und um 2 Isoenzyme mit Collagenaseaktivität.

Gewinnung der Leukozytenproteasen (s.4)

Durch Zentrifugieren von Citratblut wurde das Plasma von den zellulären Bestandteilen weitgehend abgetrennt. Die der Erythrozytenschicht aufliegende Leukozytenschicht kann dann durch vorsichtiges Absaugen mit der Pipette gewonnen werden. Die angereicherten Leukozyten werden dann mit physiologischer NaCl-Lösung mehrmals zur Entfernung von Plasmaresten gewaschen. Sie werden sodann eingefroren, wieder aufgetaut und im Zellhomogenisator weiter aufgeschlossen. Das nach Zentrifugieren erhaltene Leukozytencytosol ist noch durch erhebliche Mengen Hämoglobin verunreinigt. Es wird daher noch fraktioniert. Hierzu wird auf einer Säule (100 x 5 cm) mit Sephadex G 100, mit 0,05 M Boratpuffer enthaltend 0,1 M NaCl, pH = 8,0 gespült, etwa 200 mg Trockensubstanz aufgetragen, die zuvor in 40 ml Puffer (s.o.) aufgelöst wurde. Die Abtrennung von Hämoglobin gelingt dabei vollständig. Die Lokalisation der Proteasen nach Auftrennung im Fraktomat gelingt mit der Azokaseinmethode (s.dort). Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, dialysiert (entsalzt), und lyophilisiert. Von den so erhaltenen Leukozytenproteasen sind 850 µg wirkungsgleich mit 5 µg Trypsin, (als Standardtrypsin diente Trypsin (EC 3.4.4.4.) vom Rind, mit TPCK behandelt.)

Zur möglichst weitgehenden Reinerhaltung der Proteasen für unsere Immunisierungszwecke bot sich die Disk-Elektrophorese an. (4). Allerdings setzte dieses Verfahren eine Menge Vorarbeit

voraus, zunächst mit dem Ziel, möglichst viele verschiedene Proteasen darstellen zu können und hierfür ein Gel mit einem Substrat zu finden, das möglichst unspezifisch für die verschiedenen Proteasen sein sollte (31,3).

Für die Versuche dienten Trypsin (EC 3.4.4.4.) vom Rind, mit TPCK behandelt, sowie Chymotrypsin vom Rind, mit TLCK behandelt (Merck, Darmstadt) als Modellproteasen.

Weitere Proteasen, deren Darstellung gelang, waren die Protease aus Pseudomonas aeruginosa, dem Erreger des blauen Eiters (19), wegen seines Farbstoffes "Pyocyanin" auch "Pyocyaneus" genannt, sowie Leukozytenproteasen, gewonnen nach obigem Verfahren. Die Protease aus Pyocyaneus wurde aus Bakterien gewonnen, die in Schüttelkultur auf Peptonboullion gezüchtet wurden (Durchführg. Herr priv.-Doz. Dr. Bauernfeind, Max von Pettenkofer-Institut). Durch Ultrazentrifugation wurde die Kulturflüssigkeit gewonnen, dialysiert und gefriergetrocknet, sodann auf Sephadex G-75 wie oben die Leukozytenproteasen behandelt. Man erhielt ein neunfach angereichertes Produkt (Lokalisation der Aktivität nach der Azokaseinmethode). Nach Dialyse und Gefriertrocknung waren 100 µg wirkungsgleich mit 5 µg Trypsin.

Zur guten Darstellung der Proteasen aus Leukozytencytosolen oder anderen Sekreten (versucht wurden auch Kieferhöhlensekrete und Sputen) war es notwendig, so große Mengen an Sekreten aufzutragen, daß sie mit ungefähr 10 µg Trypsin in ihrer proteolytischen Aktivität wirkungsgleich waren.

Zugleich mit der Darstellung der Proteasen bot sich die Möglichkeit an, durch spezielle Hemmansätze mit bestimmten Proteaseinhibitoren deren Wirkungsspektrum zu untersuchen (4). Als Inhibitoren dienten hier Alpha-1-Antitrypsin vom Menschen (Behringwerke AG/Marburg), basischer Proteaseinhibitor Trasylol (Bayer/Leverkusen) sowie Bronchialsekretinhibitor vom Menschen (Laborpräparat)(5).

Der Azokaseintest

Der A. diente uns zur Aktivitätsbestimmung der Proteasen.

Ansatz des Azokaseintestes:

0,1 ml Proteaseenthaltige Lösung

0,4 ml 0,2 M Triäthanolamin x HCl-Puffer, pH= 7,8

1,0 ml Azokaseinlösung im gleichen Puffer (2%)

Inkubation je nach Aktivität 30 min. bei 37° C, nach

Inkubationszeit Fällung mit 1,5 ml Trichloressigsäure (5%).

Im zentrifugierten bzw. filtrierten Überstand wird die Extinktion im Photometer gegen einen Leerwert bei 405 nm (in diesem Falle s.4 u.29) bestimmt.

Anhand einer Eichkurve kann dann die mit z.B. 5 µg wirkungsgleiche Cytosol-, Sekret-, oder Bakterienflüssigkeitsmenge oder die entsprechende Trockensubstanzmenge ermittelt werden.

Elektrophorese (Theoretische Grundlagen)

In der Disk-Elektrophorese liegt ein hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße diskontinuierliches Trennsystem vor. Als Träger wird hierbei Polyacrylamid verwendet (21). Während die kontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese homogene Puffersysteme einheitlicher pH-Werte verwendet, führt die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese Pufferpaare unterschiedlicher Zusammensetzung sowie Gelteile unterschiedlicher Porengröße ein. Diese Diskontinuitäten führen vor Trennbeginn zu sehr schmalen, d.h. hoch konzentrierten Startzonen, die für die Schärfe der Trennungen entscheidend sind. Für das hohe Auflösungsvermögen der Disk-Elektrophorese sind zwei physikalische Effekte verantwortlich:

1. Der Konzentrierungseffekt in Anwendung der Kontinuitäts- oder Regulationsfunktion nach KOHLRAUSCH: Danach werden die Substanzen vor ihrer Trennung zu einer scharf begrenzten Zone konzentriert.

Die nach KOHLRAUSCH so benannte "beharrliche Funktion" als Ausdruck für den stationären Ablauf besagt, daß Konzentrationsverschiebungen von Ionenarten in jedem Gelteil während einer elektrophoret. Auftrennung nur derart ablaufen können, daß die Summe über alle Quotienten aus den Konzentrationen c und den Beweglichkeiten u der Komponenten unverändert bleibt.

2. Der Molekularsiebeffekt, wonach die einzelnen Moleküle elektrophoretisch nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung, sondern auch nach ihrer Größe (also ihrem Molekulargewicht) und nach ihrer Gestalt (der Tertiärstruktur) getrennt werden. Eine Proteinmischung z.B., deren gelöste Bestandteile untersucht werden sollen, wird zunächst innerhalb eines großporigen Polyacrylamidgeles zu einer schmalen Bande konzentriert und dann innerhalb eines kleinporigen Geles nach Molekülgröße, Gestalt und Ladung aufgelöst.

Bekanntlich zeichnen sich Gele gegenüber flüssigen Medien durch hohe Viskosität und damit hohe Reibungswiderstände aus. Diese Eigenschaft macht sich die Elektrophorese im Stärke-, und Polyacrylamidgel zunutze. Teilchen, die darin wandern, erfahren je nach ihren Dimensionen einen verschieden hohen Reibungswiderstand. Die Teilchen lassen sich daher nicht nur nach ihrer Ladung, sondern auch nach ihrer Molekülgröße und Molekülgestalt "aussieben" (Molekularsiebeffekt). Das gegenüber der Papierelektrophorese beträchtlich verbesserte Auflösungsvermögen der Stärkegel-elektrophorese, die SMITHIES 1955 einführte, beruht also auf einer Kombination zweier Trennprinzipien: Der elektrophoret. Beweglichkeit und des Molekularsiebeffektes.

Auf der gleichen Kombination gründet sich die Trennwirkung des Polyacrylamidgeles. Allerdings spielt der Molekularsiebeffekt nicht in allen Gelarten die gleiche Rolle. Während er in Stärke-, und Polyacrylamidgelen vorherrscht, ist er in Agar-gel unterdrückt. Polyacrylamidgele sind aus chemisch definierten Grundstoffen relativ hohen Reinheitsgrades stets reproduzierbar herzustellen (21).

Nach meinen eigenen Erfahrungen ist die Reproduzierbarkeit dieser Gele dennoch eine relative, da offenbar das Alter der einmal hergestellten Lösung von Acrylamid sowie der beigemischten Substrate wie auch das Alter bereits hergestellter Gelröhrchen schon einen Einfluß auf die Elektrophorese nimmt, z.B. indem die Gelsäulenenden, die im Puffer gelagert werden müssen, wegen der Vertrocknungsgefahr nun im Gegenteil quellen und somit bereits Einfluß auf das Eintreten der aufgetragenen Substanzen nehmen. Dazu kommt ein Unterschied bei Gelen verschiedener Firmen.

Werden allerdings in einem Ansatz nur frischer Substanzen eine Serie Röhrchen hergestellt, so ist zumindest zwischen diesen Röhrchen die Reproduzierbarkeit ausgezeichnet. Im übrigen kann man die Dichte des Gelgitterwerkes, also die Porengröße in einem weiten Bereich variieren: Für Acrylamidgel kann die Gelkonzentration etwa zwischen 2% und 30% liegen, wobei das Gel transparent bleibt.

Die Trennwirkung durch Molekularsiebeffekt tritt besonders bei Polyacrylamidgelen hervor, wenn man Proteine gleicher Ladung, jedoch unterschiedlicher Größe zu trennen hat, Proteine (oder proteasen) also, die durch trägerfreie Elektrophorese nicht aufzulösen wären. Die Wanderungsgeschwindigkeiten können sich daher in beiden Medien beträchtlich unterscheiden. Es gibt Proteine, die trotz größerer elektrophoretischer Beweglichkeit im Gel langsamer wandern als Proteine geringerer Beweglichkeit, weil sie im Gel einen größeren Reibungswiderstand erfahren als die anderen.

Bildung und Struktur des Polyacrylamidgels:

Polyacrylamidgel ist ein Polymerisations-, und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylsäureamid, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. (Abb.1) Das dreidimensionale Maschenwerk des Gels bildet sich durch Vernetzung nebeneinander wachsender Polyacrylamidketten, die nach Art der Vinyl-Polymerisation entstehen (Ko-, oder Mischpolymerisation in Lösung).

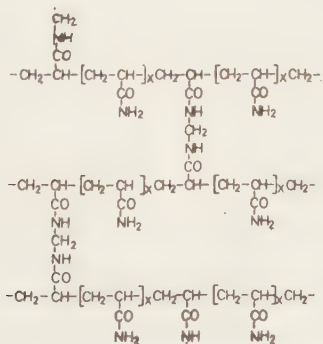


Abb. 1. Struktur des Polyacrylamid-Gels. Monomer: Acrylamid, Komonomer (Vernetzer): N,N'-Methylenbisacrylamid. Nach: Ott [303]

Dabei entwickeln sich zunächst zahlreiche, statistische Polymergelknäuel (Abb.2 A), in denen die Polyacrylamidketten den Zustand maximal möglicher Entropie einnehmen, das heißt die unregelmäßigste Gestalt. Die wachsenden Gelknäuel rücken zusammen (Abb.2 B) und vernetzen dort miteinander durch Hauptvalenzen (Abb.2 C), wo mehrfunktionelle Verbindungen wie N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer der Polymerkette eingebaut sind und mit freien, funktionellen Gruppen am Ende reagieren können.

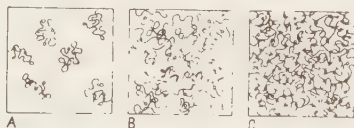


Abb. 2. Schema der Bildung des Polyacrylamid-Gels aus statistischen Gelknäueln. Übergang von der verdünnten Polymer-Lösung (A) über die konzentrierte Lösung (B) zum Gel (C). —o— Vernetzer, —●— Vernetzungsbrücke. Nach: VOLLMERT [495]

Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels hängen teils vom Polymerisationsgrad. (Kettenlänge) des Polyacrylamids, teils vom Vernetzungsgrad ab, d.h. von der Menge des eingebauten Vernetzers.

Man kann anhand theoretischer Modelle berechnen, daß 7,5%ige Polyacrylamidgele eine durchschnittliche Porenweite von 50 Å und 30%ige Gele Porendurchmesser von etwa 20 Å aufweisen. Man kann daher mit der Wahl der geeigneten Acrylamidkonzentration die gewünschte Porengröße steuern, vorausgesetzt, daß eine vollkommene Umwandlung von Monomer zu Polymer stattfindet.

Polymerisationskatalysatoren

Zur Kopolymerisation von Polyacrylamidketten für die Elektrophorese verwendet man normalerweise bestimmte Katalysatorredoxsysteme, die freie Radikale liefern (u.U. auch UV-Licht).

Man nimmt z.B.

- Ammoniumperoxydisulfat-N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
- Riboflavin-N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
- Ammoniumperoxydisulfat-3-Dimethylaminopropionitril.

Ammoniumperoxydisulfat hat folgende Vorteile: Es läßt sich in hoher Reinheit darstellen, ist bei Temperaturen um 0°C relativ stabil und neigt wenig zur Entwicklung molekularen Sauerstoffs.

Apparative Ausrüstung der Disk-Elektrophorese

Gelröhrchen und Röhrchenhalter

Bei der Elektrophorese finden Gelröhrchen aus Kuststoff (z.B. Plexiglas) und solche aus alkalischem Glas Verwendung.

Da Glas im allgemeinen wegen seiner besseren Reinigungsmöglichkeiten vorzuziehen ist, entschieden wir uns für Glasröhrchen.

Für die Herstellung von Glasröhrchen bestellten wir Glasrohre in einer Länge von etwa 2 Meter, die einen Innendurchmesser von 5 mm hatten. Der Außendurchmesser ist dann etwa 7 mm.

Die Glasröhrchen müssen leakfrei in die Gummidichtungsringe der Elektrodengefäße (in unserem Fall aus Plexiglas) passen. Wir ritzten mit dem Glasschneider durch Drehen der Röhrchen in der Hand ringsherum das Glasrohr an, so daß sich dann die einzelnen Gelröhrchen leicht abbrechen ließen und durch das Anritzen auch plane Enden bekamen. Die noch vorhandenen scharfen Ränder wurden durch kurzes Glühen des Röhrchens im Bunsenbrenner abgerundet, aber so, daß sich möglichst der Innendurchmesser der Röhrchen nicht ändern sollte.

DAVIS beschreibt Röhrchen der Länge 65-70 mm mit einer Gelsäule von 35 x 5 mm. Diese Dimensionen ergeben nach ihm eine optimale Kombination für das Konzentrieren und Trennen. Je kürzer die Gele, um so konzentrierter erscheinen die Substanzbanden; je länger die Gele, um so besser die Auflösung, jedoch um so breiter die Zonen infolge Diffusion. Sehr lange Gele würden breite, verwischte Banden ergeben, die schwer quantitativ auszuwerten wären.

Je dicker die Gele, desto mehr Joule'sche Wärme wird entwickelt und umso längere Zeit muß gefärbt und entfärbt werden.

Zylindrische Gele sollen nach DAVIS gegenüber Gelstreifen günstiger sein, weil sie gleichmäßigere Wärmegradienten während der Elektrophorese bilden. Dadurch kann man höhere Feldstärken und kürzere Trennzeiten wählen - ARNSON und BORRIS ziehen rechteckige Gelstreifen vor, weil sie sich densitometrisch besser auswerten lassen.

Für unsere Zwecke eigneten sich am besten Glasröhrchen mit einer Länge von 14 cm, wobei die Gele dann mit einer Ursprungslänge von 10 cm hergestellt wurden (ihre Länge nach dem Färben

und Entfärben war um einiges größer, da die Gele quellen (etwa 12 cm). Wir reinigten die Glasröhrchen durch Einlegen in 10%ige Dichromat-schwefelsäure, gründliches Abspülen mit Wasser (aqua dest.) und Trocknen bzw. nach der Reinigung in Dichromatschwefelsäure durch Spülen mit Leitungswasser, danach Spülen mit Methanol und Trocknen mit einem Haarföhn (anderenfalls im Hitzeschränk.) Der von DAVIS empfohlene Schritt, die Röhrchen nach dem Spülen mit Wasser in eine 0,5 % ige, wäßrige Lösung von Kodak-Photo-Flo-Lösung zu tauchen (Kodak-Photo-Flo-Lösung ist eine wäßrige Lösung eines nichtionogenen Tensids) und anschliesend zu trocknen, erwies sich für unsere Zwecke als unnötig.

Unser Elektrophoresegerät war von WTW Weilheim. Es hat eine Kapazität von 16 Gelröhrchen.

Es wurde von innen her durch Zirkulation einer vorgekühlten Lösung gekühlt und bei einer Temperatur von 4°C gehalten.

Bei einer Spannungsdifferenz von 500 Volt ergab sich bei dem von uns verwendeten Elektrophoresegerät ein Stromfluß von 6 mA pro Röhrchen.

Ansätze:

Zur Darstellung der verschiedenen Proteasen wurden als Substrat Gelatine und Azokasein verwendet.

Gelatine als Substrat: Es wurde das Gelsystem Nr.7 nach l.c. (21) verwendet, wobei soviel Gelatine zugegeben wird (in Wasser gelöst), daß eine Endkonzentration von 0,1% Gelatine im Gel erreicht wird.

- 1) Gelpuffer: 48 ml 1N KOH;
17,2 ml Eisessig
4,0 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
auf 100 ml Wasser aufgefüllt und
den pH auf 4,3 eingestellt.
- 2) Gellösung: 60 g Acrylamid
0,4 g N,N'-Methylenbisacrylamid
in 100 ml Wasser aufgelöst
- 3) 0,28 g Ammoniumperoxydisulfat
in 100 ml Wasser aufgelöst
- 4) Gelatinelösung: 0,8 g Gelatine in 100 ml Wasser gelöst
(bei leichtem Erwärmen)

Das Trenngel wird durch Polymerisation folgender Mischung hergestellt

5 Teile Nr.1, 10 Teile Nr.2, 20 Teile Nr.3, 1Teil Nr.4

Elektrodenpuffer: 3,12 g L-Alanin in 1L Wasser,
mit Eisessig (etwa 0,5 ml) auf
pH= 4,5 eingestellt,
zum Gebrauch im Elektrophoresegerät
1:10 verdünnt.

Zum Auftreten von Festsubstanzen werden diese zuvor in 20%
Saccharoselösung gelöst, Flüssigkeiten werden bis zu einer
Konzentration von 20% mit Saccharose versetzt.

Zur Elektrophorese kommen mit $100 \mu\text{l}$ Lösung eingesetzt
werden, ohne daß es zu einer wesentlichen Verbreiterung der
Zonen kommt.

Trennrichtung von der Anode zur Kathode.

Das Auftreten der Substanzen geschah folgendermaßen: die Röhrchen
mit dem polymerisierten Gel wurden mit Elektrodenpuffer aufge-
füllt, sodann wurde die entspr. Menge Substanz mit der Mikro-
pipette vorsichtig unter dem Elektrodenpuffer untergebracht,
so daß sie auf das Gel zu liegen kamen. Etwas aufgewirbelte
Substanz kann aufgrund der Lösung in der Saccharose leicht abwärts
wieder zurück auf das Gel.

Zur Markierung der Pufferfront in den Schritten wurde pro Schritts
noch $10 \mu\text{l}$ 0,2 % Methylselektolösung (in 20% Saccharoselösung) zu-
gesetzt.

Azokasein als Substrat: Azokasein präzipitiert in dem von uns
verwendeten Gelpuffer grobflockig. Diese Präzipitation ist jedoch
erwünscht, da das Substrat während der Elektrophorese nicht
wandern soll. Um eine möglichst feine, nicht grob auflockende
Präzipitation zu erhalten, wird gemäß folgender Anleitung
Festfällung zugesetzt. Man erhält dann eine nur leicht opales-
zierende Lösung, wobei es bis zum Polymerisieren der Gele
(spätestens 30 min. nach Ansatz) nicht zu einer groben Ab-
flockung und zum Absetzen des Azokaseins kommt.

Herstellung des für die Leukozytenproteasen später einzuführen
verwendeten Azokaseingels:

- 1) Gelpuffer: 48,0 ml 1N. KOH
4,0 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
etwa 17,0 ml Eisessig
mit Wasser auf 100 ml aufzufüllen, und mit Eisessig;
ist der pH auf 4,3 einzustellen.
- 2) Gellösung: 60,0 g Acrylamid
0,4 g N,N'-Methylenbisacrylamid
in 100 ml Wasser aufzulösen
- 3) Azokasein 2%ig gelöst in Wasser, z.B. 2g/ 100ml Wasser
- 4) Pectin 1%ig gelöst in Wasser, mit KOH auf pH=4,3 eingestellt.
Da sich Pectin in Wasser sehr schlecht löst, ist zum
Auflösen Erhitzen des Wassers und ständiges Rühren
erforderlich.
- 5) . Ammoniumperoxydisulfat krist.

Ansatz, wie er von uns stets verwendet wurde (mit Mengenangaben)

10 ml Gellösung (Nr.2)

5 ml Gelpuffer (Nr.1)

15 ml Wasser

Diese Mischung wird zunächst in einem Glas aufbewahrt. Hierauf
mischt man in einem anderen Glas

5 ml Azokaseinlösung 2% (Nr.3) und

5 ml Pectinlösung 1% (Nr.4).

Dieses getrennte Mischen von Azokasein mit Pectin dient der
besseren Suspensierung des Azokaseins.

Man vereinigt nun unter Rühren die beiden Gemische und fügt noch
56 mg Ammoniumperoxydisulfat hinzu.

Dieser Ansatz wurde dann in Glasröhrchen (s.o.) jeweils 10 cm hoch
eingefüllt (die Höhe wurde zuvor mit Fettstift markiert) und
vorsichtig mit Wasser überschichtet, um einen geraden Meniskus
der Geloberfläche zu erhalten, und um das Gel von Luftsauerstoff
zu trennen, bis die Polymerisation eingetreten war.

Der Elektrodenpuffer für das Azokaseingel ist derselbe wie für
die Gele mit Gelatine als Substrat,(s.o.)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen
Substanzen wurden die Gele aus den Glasröhrchen geholt,; dies
geschah durch einführen einer langen Kanüle, wobei unter Drehen

des Glasröhrchens als Gleitmaterial Glycerin 7% in Wasser mit der Spritze zwischen Glaswand und Gel gespritzt wurde.

Hierauf wurden die Gele in je 50 ml Phosphatpuffer (67mM Dinatriumhydrogenphosphat), pH = 8,0 bei 37° C inkubiert.

Als Inkubationszeit genügt hierbei für aktivere Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Proteasen aus *Pyocyanus* 30 - 60 min.

Bei schwächeren Aktivitäten, wie sie sich bei Leukocytenproteasen und anderen proteasehaltigen Sekreten finden, wurden Inkubationszeiten von 4-12 Stunden erfolgreich angewendet.

Bei Azokaseingelen konnte die Ausbildung von Verdauungszonen während der Inkubation direkt beobachtet werden, da an den Stellen der Verdauung die Opaleszenz aufgehellt wird bei Betrachtung gegen das Licht.

Weitere Ansätze, die versucht wurden: (4)

Bei der Herstellung des Azokaseingels wurde als Dispersionsmittel für das Azokasein anstatt Pectin auch Agarose und Gummi arabicum verwendet.

Bei Verwendung von Agarose ist allerdings eine gewisse Erwärmung des Monomergemisches unvermeidlich, wodurch die Polymerisation der Gele unkontrollierbar wird, da sich Gele unterschiedlicher Porengröße bilden.

Bei Versuchen mit Gelen unter Zusatz von Gummi arabicum stellte sich heraus, daß die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin nicht darstellbar waren (4) Entweder ist das Polysaccharid selbst ein Inhibitor für diese Proteasen oder die Handelsprodukte (DAB 6) enthalten einen spezifischen Proteaseninhibitor.

Außerdem wurde versucht, Gele mit Elastin-Orcein herzustellen. Es gelang, das Elastin-Orcein, in Pectin gelöst, durch Ultraschall teilweise feinzususpendieren und mit der 4fachen Menge des Azokaseins in Gelröhrchen so lange in Suspension zu halten, bis die Polymerisation einsetzte.

Hierbei sank allerdings noch ein kleiner Teil vor der Polymerisation der Gele ab, weshalb noch die doppelte Menge Ammonium persulfat zugefügt wurde, um das Festwerden der Gele zu beschleunigen. Bei dieser Versuchsanordnung zeigten die verwendeten Proteasen allerdings keine eindeutigen Verdauungsringe im Gel.

Anfärbung:

Darstellung der Verdauungsringe der Proteasen durch negative enzymatische Anfärbung:

Die negative enzymatische Anfärbung erfolgt durch Anfärben der nicht verdauten Substrate mit geeigneten Farbstoffen nach Inkubation der Gele im Phosphatpuffer.

Bei Verwendung von Gelatine als Substrat werden die Gele 30 min. in 0,2%ige Ponceaulösung in 5%iger Trichloressigsäure gelegt, Bei Verwendung von Azokasein 30 min. in gesättigte Azokarminlösung in 5%iger Trichloressigsäure.

Nach dem Färben werden die überschüssigen Farbstoffe mit 7%iger Essigsäure ausgewaschen (entweder durch einen Apparat, der die Essigsäure ständig reinigt und damit die Gele umspült oder durch einfaches Einlegen der Gele in die Essigsäure und öfteres Erneuern derselben). Schließlich sind die Gele überall gefärbt mit Ausnahme der Stellen, an denen die einpolymerisierten Substrate durch Proteasen verdaut wurden. Diese Stellen stellen sich dann als farblose weiß-transparente Ringe dar.

Hemmansätze:

K.HOCHSTRASSER u.K.SCHORN gelang es, durch Zusätze von bestimmten Inhibitoren im Überschuß (etwa 100 mIU bezogen auf die Hemmwirkung gegen Trypsin), bei pH-Werten um 7 in den Ansätzen, die selektive Hemmbarkeit einzelner Proteasen mit den oben aufgeführten elektrophoretischen Verfahren zu untersuchen und nachzuweisen. (4)

Dokumentierung:

Es bestehen für unsere Zwecke zwei Möglichkeiten der Dokumentierung. Einmal die photographische (s.Abb.), zum anderen durch Registrierung der Transmission entlang des Gels. (4) Für die Zwecke dieser Arbeit hatte aber nur die photographische Darstellung Bedeutung, zumal die densitometrische Auswertung aufgrund verschiedener Fehlermöglichkeiten problematisch ist.

Ergebnisse:

Mit den oben genannten elektrophoretischen Verfahren, in denen hier als Substrate nur Gelatine und Azokasein von Bedeutung sind, gelang es, die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin, eine Protease aus *Pseudomonas aeruginosa* und drei Isoenzyme von Leukozytenproteasen reproduzierbar darzustellen. Außerdem gelang es, das Proteasenbild bei Auftragen von Schleimhautsekreten bei Otitis media darzustellen.

Aufgrund der hohen Aktivität der Proteasen aus Kieferhöhlensekreten ließ sich ein langsam wandernder, starker Verdauungsring ähnlich dem Bild bei Otitis media darstellen, doch waren hier noch zusätzliche Verunreinigungen in Form von Proteinen (dunklere Färbungsringe) oder nicht näher bekanntem Material dabei. Es ließ sich bei geeigneten vorherigen Reinigungsverfahren der Sekrete hier noch ein etwas besseres Ergebnis erzielen.

Ebenfalls ähnlich, aber in schwächerer Aktivität ließ sich ein Gemisch verschiedener Sputen (aufgelöster lyophilisierter Trockensputen) darstellen.

Von weiterem Interesse im Hinblick auf diese Arbeit waren allerdings nur die Leukozytenproteasen.

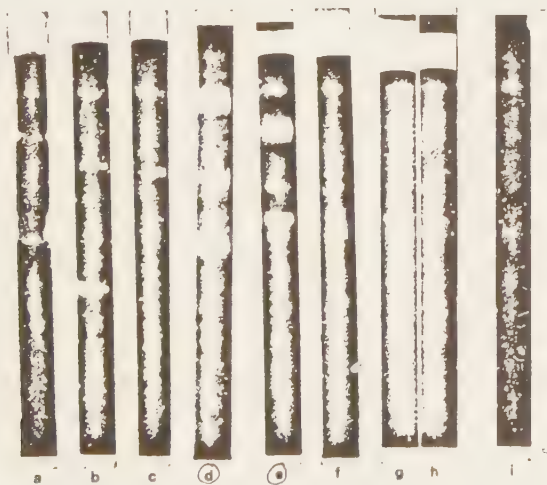


Abb. 1.

- a) Trypsin, Chymotrypsin (je 5 µg), Protease aus *Pseudomonas aeruginosa* 100 µg in Gelatine-Gel;
- b) Trypsin (Chymotrypsin (je 5 µg), Protease aus *Pseudomonas aeruginosa* 100 µg in Azokasein-Gel;
- c) gleiche Proteasen wie b, vorinkubiert mit 100 mIU basischen Proteaseninhibitor Trasylol in Azokasein-Gel;
- d) 2 mg Leukozytencytol in Gelatine-Gel;
- e) 2 mg Leukozytencytol in Azokasein-Gel;
- f) 2 mg Leukozytencytol in Azokasein-Gel, vorinkubiert mit 100 mIU α -1-Antitrypsin;
- g) Schleimhautsekret bei Otitis media;
- h) Schleimhautsekret bei Otitis media, vorinkubiert mit 100 mIU α -1-Antitrypsin;
- i) Schleimhautsekret bei Otitis media, vorinkubiert mit 50 µl Humanserum.
- j) 50 µl Humanserum.

Die Abbildung ist der Veröffentlichung Nr.4 entnommen, da sie auch die Darstellung der Leukozytenproteasen, insbes. mit Azokaseingel beinhaltet.(s.Abb. Gelröhrchen e)

Versuch der besseren elektrophoret. Darstellung der Kieferhöhlensekretproteasen.

Da, wie oben angedeutet, in der Elektrophorese sichtbare Verunreinigungen, vermutlich Proteine, das Wandern der Sekretproteasen behinderten, versuchten wir das Sekret vorzureinigen.

Es wurden zu diesem Zweck 1,25g lyophilisiertes Kieferhöhlensekret in 15 ml 0,05 M Boratpuffer pH = 9,0 aufgelöst und in demselben Puffer dialysiert zur Entfernung von anderen Salzen. Danach wurden gröbere Verunreinigungen in der Ultrazentrifuge 10 min. bei 20 000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde nun auf einer Säule über DEAE-Sephadex mit Steigenden NaCl-Konzentrationen fraktioniert, so daß nach jedem meßbaren Pick die NaCl-Konzentration erhöht wurde:

0,05 M Boratpuffer, ...+ 0,2 M NaCl, ...+ 0,5 M NaCl, ...+ 1,0 M NaCl.

Sodann wurden aus einzelnen Gläsern Proben von 1 ml (Substanz in Puffer gelöst) entnommen und deren Aktivität im Azokaseintest bestimmt: 1 ml Substanz in Puffer, 1 ml Azokasein 2%, 2 ml 5% Trichloressigs., im Photometer gemessen bei 366nm nach 5 Stunden Verdauungszeit bei 37°C. Die Ergebnisse dieser Messungen Extinktionsdifferenzen sind bei den untersuchten Gläsern in der Kurve (s.Abb.) eingezeichnet.

Die aktiven Picks ergaben sich aus den Messungen, die entsprechenden Gläsern des Fraktomaten wurden vereinigt und dialysiert (in Dialyseschläuchen zuerst in Leitungswasser, dann in Aqua dest. zur Entfernung der Ca^{++} -Ionen.) und lyophilisiert. Die Aktivität der lyophilisierten Fraktionen ließ sich nun relativ ausdrücken in der Einheit :

$$\text{Ext. diff.} / \text{mg} \cdot \text{h}$$

also Extinktionsdifferenz pro mg lyophilisiertes Substrat und Stunde Verdauungszeit.

Auf diese Einheit umgerechnet, erhielten wir für unsere 3 Fraktionen folgende Werte: (In der Kurve mit FI, FII, FIII bez.)

$$\text{Fraktion I} : E_{\text{diff.}} = 0,194 \text{ (dE/mg h)}$$

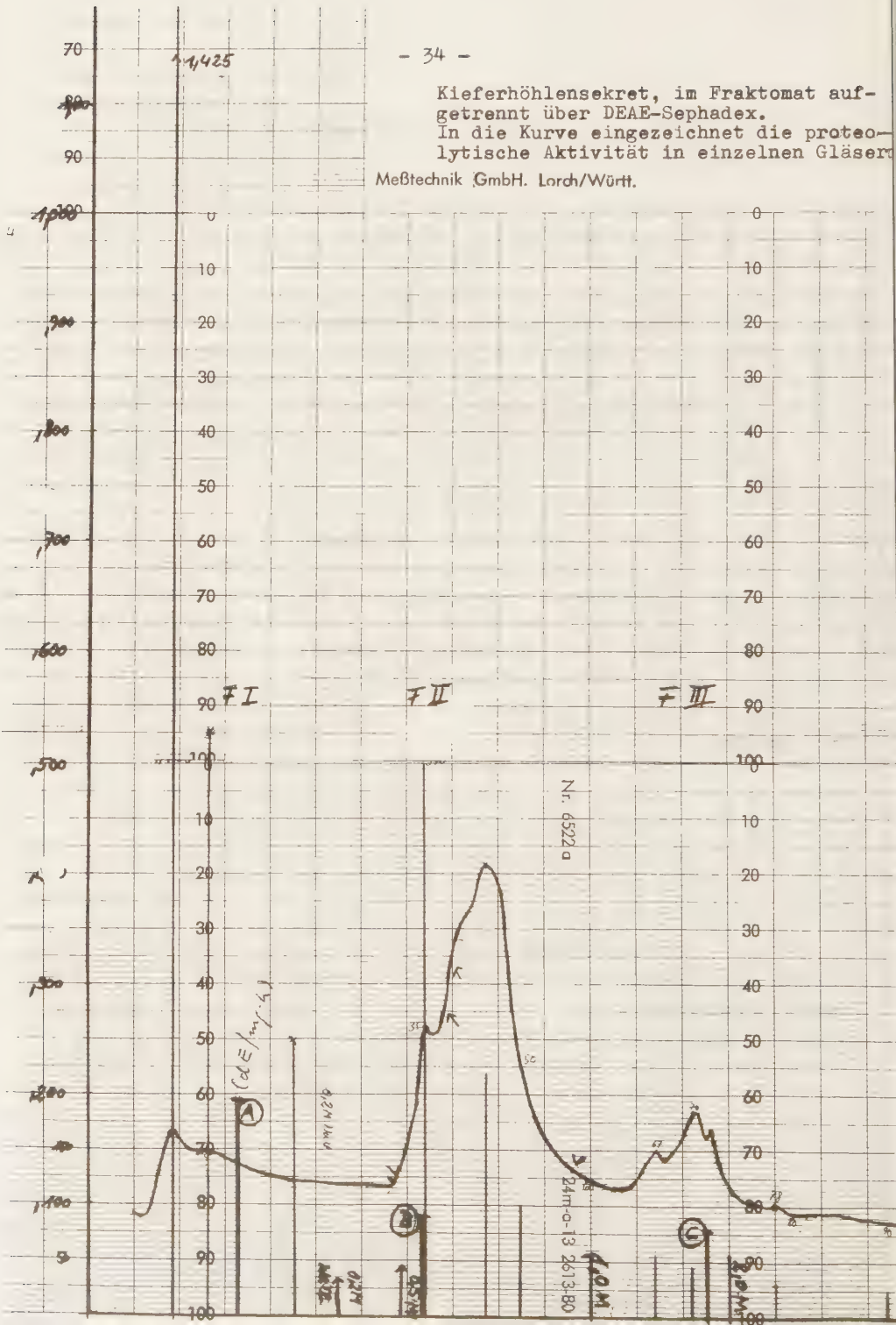
$$\text{Fraktion II:} \quad = 0,098$$

$$\text{Fraktion III:} \quad = 0,076$$

In der Kurve des Fraktomaten sind die auf die obige Einheit umgerechneten Werte für die 3 Fraktionen eingezeichnet (maßstabsgetreu, mit A,B,C bezeichnet.

Kieferhöhlensekret, im Fraktomat auf-
getrennt über DEAE-Sephadex.
In die Kurve eingezeichnet die proteo-
lytische Aktivität in einzelnen Gläsern

Meßtechnik GmbH. Lorch/Württ.

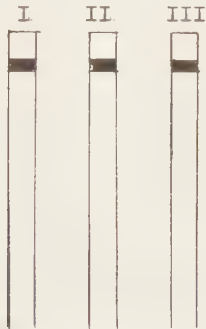


Von den so vorgereinigten Kieferhöhlensekreten wurden nun pro Fraktion 5mg lyophilisiertes Sekret aufgelöst in 120 μ l Wasser, die nicht oder schlecht löslichen Reste abzentrifugiert und vom Überstand 50 μ l auf je ein Gelföhrchen der Diskelektrophorese aufgetragen (mit Saccharose versetzt).

Als Laufzeit nahmen wir die Zeit, die das zusätzlich aufgetragene Methylenblau benötigte, um die Gele zu durchlaufen. (etwa 3 Stunden)

Als Verdauungszeit (in Phosphatpuffer pH = 8 bei 37°C) wurden für die Fraktion I, also die aktivere, 12 Stunden gewählt, für die Fraktionen II und III 24 Stunden.

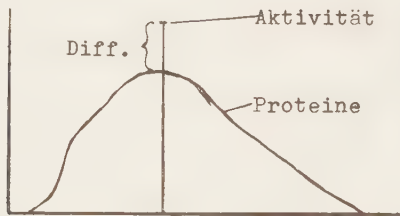
Ergebnis:



Wie das gezeichnete Bild der gefärbten Gele zeigt, ließ sich nun eindeutig eine langsam wandernde Protease , und zwar dieselbe in allen drei Fraktionen, diskelektrophoretisch nachweisen.

Versuch der besseren elektrophoretischen Darstellung
von Sputengemischen

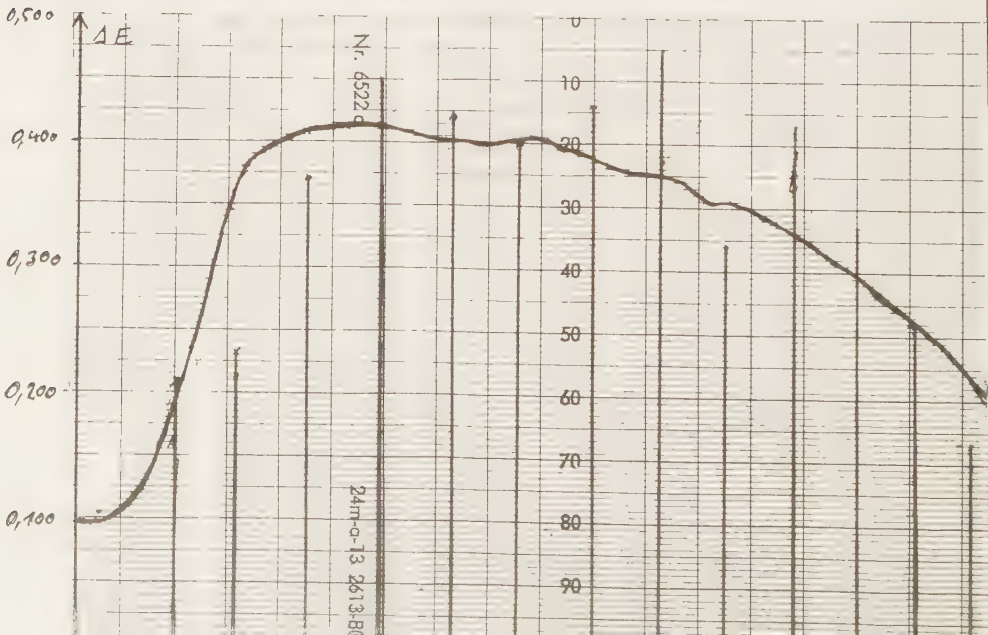
Unser Ziel war es, nach Möglichkeit durch Fraktionieren die im Sputengemisch enthaltenen Proteasen von Proteinen, wie sie in der Kurve des Fraktomaten dargestellt werden, zu reinigen. Als positives Ergebnis wäre es dann zu werten, wenn die in der Kurve angetragene Differenz zwischen Aktivität und Proteinen möglichst groß wäre.



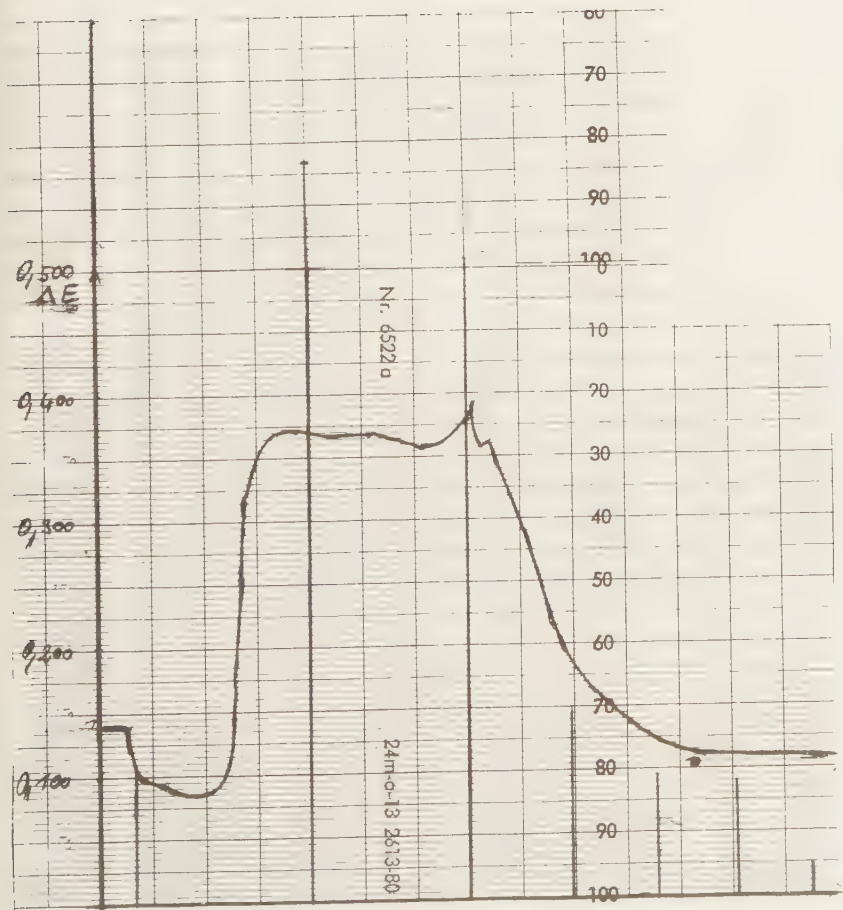
Wir trugen jeweils 1,5 g Trockensputengemisch, gelöst in 0,05 Boratpuffer (50 ml), enthaltend 0,1 M NaCl auf DEAE-Cellulose mit steigenden NaCl-Konzentrationen fraktioniert.

Säule: 2,5 x 150 cm.

pH = 8,0 1 Verdauungszeit 18 Stunden! Vgl. Kieferh.sekrete:5 St



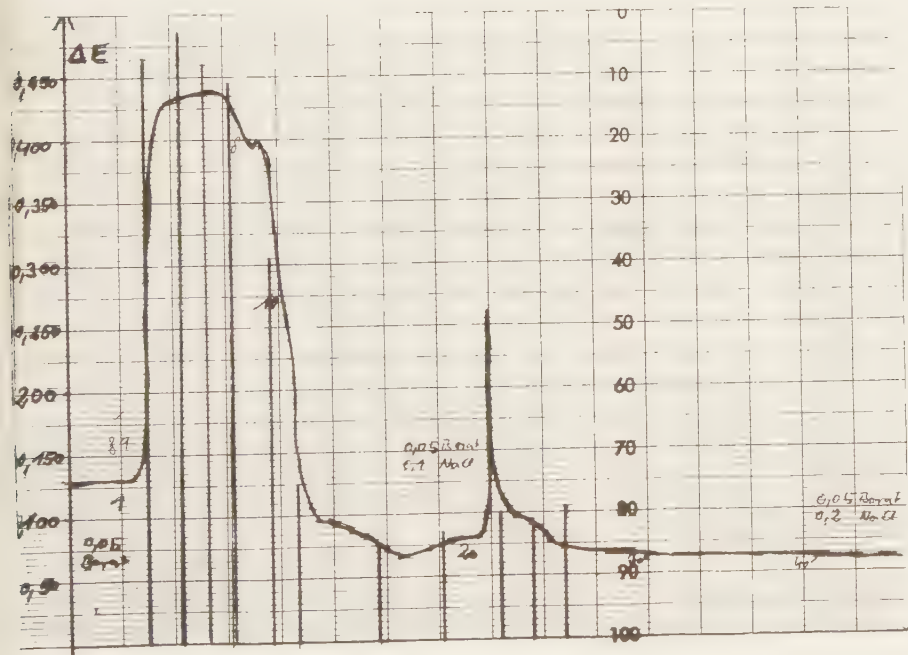
Um zu prüfen, ob der pH-Wert einen Einfluß auf die Trennung von Proteasen und Proteinen hat, ließen wir eine weitere Menge Sputen von 1,5 g unter gleichen Bedingungen wie zuvor fraktionieren, mit dem einen Unterschied, daß der pH des Puffers statt wie zuvor 8,0 nun 8,5 war.



Ergebnis: Wie die Kurven zeigen, ist eine Aktivitätszunahme zunächst festzustellen. Allerdings könnte diese Aktivitätszunahme auch auf den veränderten Milieubedingungen und nicht auf einer echten Anreicherung der Proteasen beruhen.

Deshalb wurden die Aktivität enthaltenden Fraktionen der letzten Versuche gesammelt, dialysiert und gefriergetrocknet.

Zuletzt wurde das Material in 50 ml 0,05 M Boratpuffer pH 7,5 über CM-Cellulose fraktioniert, wiederum mit steigenden NaCl-Konzentrationen.

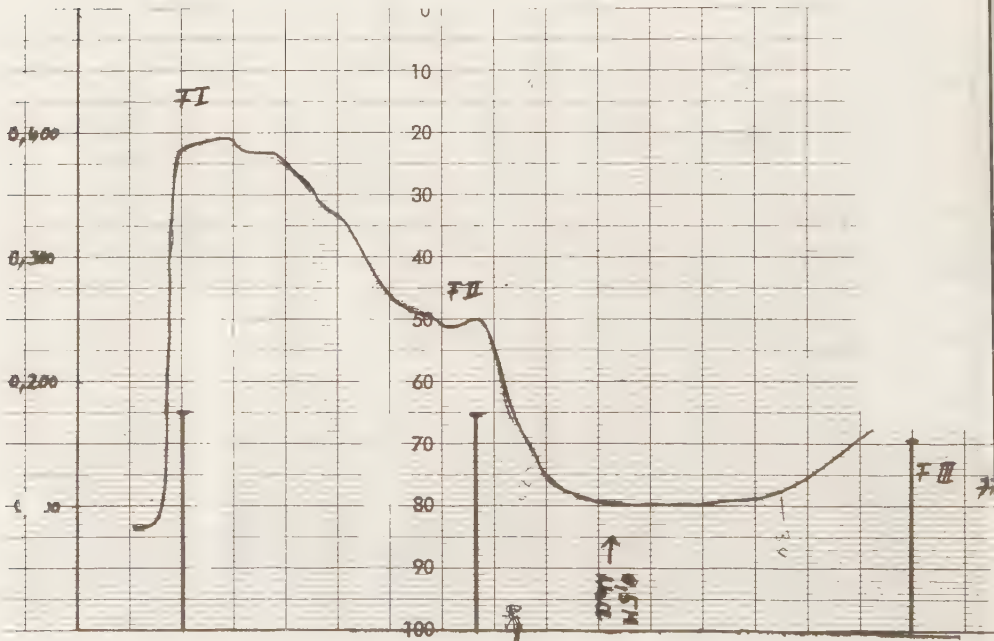


Bei nochmaligem Fraktionieren der Sputen über DEAE-Cellulose ließen sich nun 4 Picks in der Kurve isolieren, deren jeweilige Aktivität, umgerechnet auf die Einheit

Extinktionsdifferenz/ mg Trockensubstanz und Stunde Verdauung

folgende Werte hatten:

Fraktion I	: 0,0138 (dE/mg.h)
Fraktion II	: 0,0142
Fraktion III	: 0,0122
Fraktion IV	: 0,0072



Die Kurve der Picks III und IV ist weggelassen, da die Werte hier nicht mehr von Interesse waren.

Ergebnis: Wie die Kurve oben zeigt, ließ sich keine so hohe Anreicherung wie bei den Kieferhöhlensekreten erzielen. Um dieselbe Aktivität wie die der Kieferhöhlensekretproteasen zu erreichen, müßten die untersuchten Sputen etwa um das 15-fache angereichert werden. Dies ist mit den bisherigen Methoden nicht möglich gewesen. Die diskelektrophoretische Darstellung ließ sich demnach auch nicht wesentlich für Sputengemische verbessern.

Reindarstellungsverfahren für Leukozytenproteasen:

Azokaseingel

Für unsere Immunisierungszwecke konnten die Proteasen in großer Reinheit und genügender Menge relativ schnell mit der Disk-elektrophorese gewonnen werden. Bei den von Ohlsson (22) und Janoff (14) aus menschlichen Leukozyten isolierten alkalischen Proteinasen handelte es sich um 3 Isoenzyme mit elastolytischer Aktivität und um 2 Isoenzyme mit Collagenasenaktivität. Um diese Enzyme handelte es sich bei unserem Darstellungsverfahren.

Es wurden jeweils 20 mg lyophilisierte Leukozytencytosole in 0,3 ml Aqua dest. aufgelöst und kräftig geschüttelt, sodann wurden die nicht löslichen Reste in der Zentrifuge bei etwa 6000 Upm abzentrifugiert.

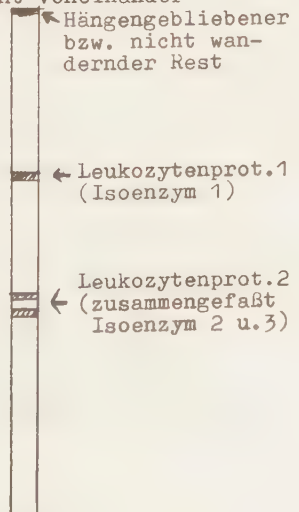
Der Überstand wurde abgossen und mit Saccharose versetzt. Für die Diskelektrophorese wurden pro Röhrchen Azokaseingel (Gellänge im Röhrchen 10 cm) 100 µl des oben genannten Überstandes aufgetragen und etwas Methylenblau zugegeben.

Nun wurden die aufgetragenen Substanzen in der Diskelektrophorese zunächst für 1 Stunde bei einer Gesamtspannung von 100 Volt zentriert (das war für uns die beste Zentrierzeit; längere Zentrierzeiten wären sinnlos gewesen, da die Substanzen dann bereits langsam in die Gele eingewandert sind).

Zuletzt wurde die Spannung auf 500 Volt erhöht und die Substanzen 5 Stunden diskelektrophoretisch aufgetrennt. (Zu einer deutlichen Auftrennung hätten kürzere Zeiten auch genügt, doch lagen in dieser Zeit die Verdauungsringe am weitesten voneinander entfernt, so daß sie sich am leichtesten getrennt voneinander herausschneiden ließen.

Das nach Färben und Entfärben
Entstehende Bild stellte sich dann
regelmäßig etwa wie in Abb. dar:

Da die Ringe der Isoenzyme 2 und 3 sehr nahe beisammen lagen und somit schlecht getrennt ausgeschnitten werden konnten, da sie zusätzlich praktisch immunologisch gleich reagierten, nahmen wir sie als eine Protease.



Es wurden pro Lauf 16 mal 100 μ l Leukozytencytosol laufen gelassen. Davon färbten wir meist zwei Röhrchen nach dem Verdauen in Phosphatpuffer an. Die übrigen Röhrchen wurden in dieser Zeit im Elektrodenpuffer gekühlt belassen (ohne Spannung). Von den gefärbten Röhrchen, deren Proteasen zwar denaturiert waren durch die Essigsäure, die man aber sehen konnte, wurde nun auf den Sitz der aktiven Proteasen in den nicht gefärbten Röhrchen geschlossen. Da die gefärbten Gele um etwa 2,5 cm in der Länge gequollen waren, war eine kleine Verhältnisrechnung nötig, um den Sitz der Proteasen 1 und 2 in den ungefärbten Gelen zu finden.

Die Gelscheibchen, die Leukoprot. 1 bzw. 2 enthielten, wurden nun mit einer Rasierklinge herausgeschnitten und gesammelt. In einem Becherglas (Inh. etwa 25 ml) wurden die Gelscheibchen nun mit einem Glasstab möglichst fein zermörsert und zerrieben, worauf noch 5ml physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) zugefügt wurde.

Die Gele in der Kochsalzlösung wurden nun ein bis zwei Tage lang im Eisschrank, unter ständigem Rühren mit einem Rührer und einem "Fischchen", stehen gelassen, um den Proteasen Zeit zu geben, aus den Gelen in die Kochsalzlösung herauszudiffundieren. Auf diese Weise wurden für die spätere Injektion an Kaninchen jeweils 2 bis 3 solcher Bechergläser zusammengefaßt.

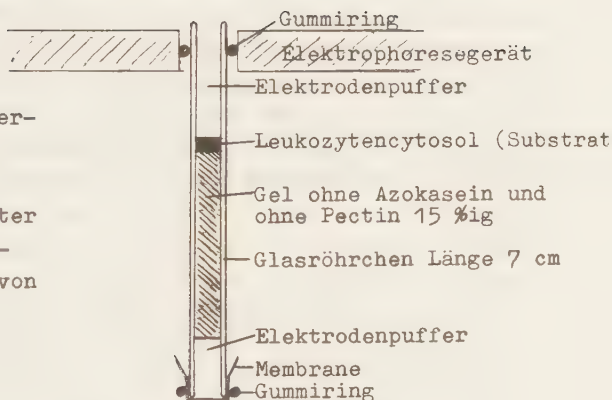
Weiteres Verfahren zur Reindarstellung der Proteasen:

Da das oben genannte Verfahren zwar erfolgreich für die Gewinnung von reinen Leukozytenproteasen war, es aber gerade für die Gewinnung größerer Mengen doch relativ arbeitsaufwendig und auch mit Fehlermöglichkeiten behaftet ist (die gefärbten Gele quellen, diese Gelsorte ist nur schwer gut reproduzierbar, es gibt leichte Wanderungsgeschwindigkeitsunterschiede in den einzelnen Röhrchen) suchten wir nach einem neuen, besseren Verfahren, um die Leukozytenproteasen von verunreinigenden Proteinen und anderen Stoffen zu trennen.

Es fand sich in der Kombination der Elektrophorese mit der Verwendung von Membranen als "Sammelreuse" für die Proteasen.

Die nächste Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der neuen Gelröhrchen in dem nun erprobten Verfahren.

Da in dem nebenstehenden Verfahren das Gel nicht zur Darstellung von Proteasen dient, sondern nur als Filter gegen Verunreinigungen, erübrigten sich die Zusätze von Azokasein und Pectin.



Hergestellt wurden die Gelröhrchen, indem im Röhrchenhalter zunächst entsprechend dem unteren gelfreien Raum im Röhrchen gesättigte Saccharoselösung eingegefüllt wurde, die dann mit dem noch nicht polymerisierten Gel überschichtet wurde. Über das Gel wurde wie üblich Wasser überschichtet. Diese Überschichtungen waren aufgrund der Dichteunterschiede der einzelnen Flüssigkeiten nicht allzu schwierig. Nach dem Festwerden des Geles wurde die Zuckerlösung aus dem Röhrchen mit Wasser herausgespült, und das Röhrchen wurde zur Vermeidung von Luftblasen unter dem Flüssigkeitsspiegel des Elektrodenpuffers mit einem Stückchen Membrane und einem Gummiring (Verwendet wurden die Dichtungsringe des Elektrophoresegerätes) verschlossen.

Es galt nun, eine geeignete Membrane zu finden.

Einfache Dialysierschlauchmembranen (semipermeable Membranen) eigneten sich für unsere Zwecke nicht, da bei gleichbleibender Stromspannung die Stromstärke in kurzer Zeit (15-30 min.) auf 0 sinkt. (vielleicht laden sie sich auf o. verändern sich sonstwie) Wir versuchten es nun mit Kollodiumhülsen, wie sie zur Druckdialyse verwendet werden (vorheriges Wässern erforderlich). Die Stromstärke sank zunächst zwar auch etwas, blieb aber dann auf einem bestimmten Wert konstant. Wir beobachteten ferner, daß die Kollodiumhülsenmembranen praktisch kein Methylenblau hindurch lassen; es sammelt sich auf ihnen und scheint irgendwie die Poren der Membranen zu verstopfen, da unter Verwendung von Methy-

-lenblau die Stromstärke auf 0 sinkt. Deshalb ließen wir, solange wir die Wanderungsgeschwindigkeit der Pufferfront beobachten wollten, die Glasröhrchen unverschlossen, und verschlossen sie erst, nachdem die Front und das schnellere Methylenblau die Gele durchwandert hatte. So konnte man die Proteasen noch mit den Membranen abfangen.

Als weitere Membranen versuchten wir Membranen aus regenerierter Cellulose und Celluloseacetatmembranen. Sie hatten den Vorteil, daß man sie nicht erst mit der Schere zurechtschneiden mußte, da man sie im geeigneter Scheibchenform zu kaufen bekommt, und daß beide Membranen das Methylenblau hindurch lassen, ohne daß die Stromstärke darunter leidet, und daß sie die Leukozytenproteasen mindestens so gut wie Kollodiumhülsenmembranen halten. Sie lassen sich außerdem besser über die Gläschen stülpen, da sie nicht so steif wie Kollodiumhülsen sind. Die Durchlässigkeit des Methylenblaus war für uns aber nicht mehr so wichtig, da wir es nicht mehr verwendeten, nachdem wir uns von der Funktion des Verfahrens überzeugt hatten.

Zuletzt versuchten wir noch eine Anreicherung der Proteasen an der Grenze zweier verschieden konzentrierter Gele (das obere 15 %ig, das untere 30 %ig) doch dieses Verfahren zeigte keine befriedigenden Ergebnisse, da die Proteasen die Gelgrenze relativ schnell durchwanderten, und da man 30 %ige Gele nur noch aus dem Röhrchen herausholen kann, indem man die Glasröhrchen zerdrückt.

Die erhaltenen Aktivitäten pro Röhrchen wurden mit Hilfe des Azokaseintestes gemessen:

Ansatz: 2 ml Azokaseinlösung 2%ig in TRA-Puffer gelöst
0,5 ml in Elektrodenpuffer bzw. in physiol. Kochsalzlösung gelöste gereinigte Leukozytenproteasen.
2,5 ml Trichloressigsäure 5%ig zum Stoppen der Aktivität der Proteasen.

Der entstehende Niederschlag des denaturierten Azokaseins wurde in der Zentrifuge bzw. Ultrazentrifuge abzentrifugiert und gefiltert.

Gemessen wurde bei 366 nm, das Photometer wurde mit Aqua dest. auf 0 geeicht.

Die Ergebnisse des Azokaseintests können hier nur die relativ erhaltene Aktivität pro Röhrchen wiedergeben, so daß die Extinktionswerte nur etwas über die Vor-, und Nachteile der von uns erprobten Reinigungsverfahren aussagen.

Bei unserem ersten Verfahren (also dem Herausschneiden der proteasehaltigen Gelabschnitte) ergab sich:

$$E_{\text{diff.}} = 0,85 \quad (\text{Verdauungszeit im Test 12 Std.})$$

Unter entsprechenden Bedingungen ergab die Extinktion für die mit Membranen gewonnenen Proteasen

$$E_{\text{diff.}} = 2,50$$

Ein weiterer Vergleich der gewonnen Aktivitäten mit den einzelnen Membransorten ergab eine Extinktionsdifferenz zu dem jeweiligen Leerwert (Q-Eichung mit Aqua dest.), Verdauungszeit jetzt 1,5 Tage!

Kollodiumhülsenmembranen:

$$E_{\text{diff.}} = 6,10$$

Regen. Cellulosemembranen:

$$E_{\text{diff.}} = 5,60$$

Celluloseacetatmembranen:

$$E_{\text{diff.}} = 6,10$$

Die Messungen zeigen, daß die aus 100 μ l Leukozytencytosol jeweils gewonnen Aktivitäten unter Verwendung des Verfahrens mit Membranen deutlich über den gewonnenen Aktivitäten beim Herausschneiden aktiver Gelabschnitte liegen. Die Messung zeigt außerdem, daß die gewonnenen Aktivitäten bei Verwendung der verschiedenen Membranarten praktisch gleich sind. Der Verlust bei den herausgeschnittenen Gelabschnitten ist verständlich, wenn man bedenkt, daß man mit dem Herausschneiden von Scheibchen schon durch die Fehler beim exakten Finden der aktivsten Abschnitte in Kauf nehmen muß, und daß ferner schon durch das lange Wandern in den doppelt so langen Gelen stets ein Teil der Proteasen unterwegs hängen bleibt (s.4 , "Dokumentierung") Dafür hat dieses Verfahren den Vorteil höherer Spezifität, da man z.B. nur ein Isoenzym gesondert herauszuschneiden kann.

Gewinnung von Antileukozytenproteinaseserum:

Bereitung der Injektionen für Kaninchen

Wie oben beschrieben, wurden die Gelabschnitte 1 und 2 getrennt in Kochsalzlösung belassen, um ein Herausdiffundieren der Enzyme aus dem Gel zu erreichen. Es wurden jeweils die Aktivitäten von 2-3 Elektrophoreseläufen gesammelt und die Gele nach Diffusion von der Kochsalzlösung getrennt (durch Filtration). Die Kochsalzlösung, die nun das aktive Material enthielt, wurde nun durch Druckdialyse auf etwa 2 ml eingeengt und mit 0,5 ml Formalinlösung versetzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Das Formalin ließen wir 30 min. einwirken.

Zuletzt wurden noch 0,5 ml eines öligen Adjuvans hinzugefügt und das Gemisch mehrmals durch eine dünne Kanüle gepreßt, um eine feine Emulsion zu erhalten.

Diese Emulsion wurde nun regelmäßig 2mal pro Woche den Kaninchen in die obere Beinmuskulatur ihrer Hinterläufe injiziert. Bis zum ersten Nachweis von Antikörpern war eine Zeit von 2 bis 2,5 Monaten nötig.

Die Blutentnahme bei Kaninchen und Serumgewinnung

Für die weiteren Versuche wurde den Kaninchen aus den Ohrvenen Blut entnommen. Zur besseren praktischen Durchführung wurden die Ohren mit einem Mittel, wie es kosmetische Firmen zur Enthaarung menschlicher Achselhöhlen anbieten, enthaart. Die Ohrvenen, die nun gut sichtbar waren, ließen sich nun mit leichtem Druck mit dem Finger stauen, worauf man mit feinen Kanülen das Blut absaugen konnte.

Das Blut wurde nach der Entnahme zentrifugiert, wobei sich das Serum als Überstand ergab.

Ergebnisse und Diskussion

Kombiniert man die unter "Methoden" im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Reinigungsverfahren, so ist es möglich, freien und aktiven Inhibitor von dem maskierten, proteinasengebundenen inaktiven Inhibitor abzutrennen und um den Faktor 1250 anzureichern.

Die Ergebnisse der einzelnen Anreicherungs-schritte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Anreicherung des maskierten, säurestabilen Bronchialsekretinhibitors.

Reinigungsschritt	mIU/mg Protein	Anreicherungs- faktor
Sephadex G 75	0,1	-
DEAE - Cellulose	1,8	18
Sephadex G 100	10,0	100
CM - Cellulose	125,0	1250

Aus dem Elutionsverhalten der Komplexe auf Sephadex G 75 und G 100 kann auf deren Molekulargewichte geschlossen werden. Sie bewegen sich um 48 000.

Der freie Inhibitor hat ein Molekulargewicht von etwa 14 000. Das Protein, das als Bindungspartner im Komplex gebunden ist, müßte demnach ein Molekulargewicht von mindestens 34 000 haben. Aus reinem Komplex müßte deshalb $14\,000/34\,000 = 290\mu\text{g}$ aktiver Inhibitor pro Milligramm Komplex freisetzbar sein durch die Ausfällung des Proteinanteils mit Perchlorsäure. Das bedeutet, daß ungefähr 500 mIU/mg Protein aus dem Komplex gelöst werden müssen, weil die spezifische Aktivität des freien Inhibitors gegen Trypsin 1700 mIU/mg Protein beträgt. Unser Ausgangsmaterial beinhaltet 125 mIU/mg Protein, das bedeutet, daß 25% des Materials komplexgebunden ist.

Wie schon erwähnt, war eine weitere Reingewinnung nicht möglich, da unter Verwendung anderer Ionenaustauscher und bei pH-Werten unter 6,5 sich die Komplexverbindung löste. Allerdings war die Konzentration für unsere Zwecke ausreichend.

Der niedermolekulare Schleimhautinhibitor zeigt eine immunologische Verwandtschaft mit dem humoralen Inter-alpha-trypsin-inhibitor (13): Er reagiert mit spezifischen Antikörpern ebenso wie mit Antikörpern gegen den humoralen Inhibitor.

Die Abb.2 zeigt die Immunelektrophorese des Inter-alpha-trypsin-inhibitor und des Schleimhautinhibitors. Beide Inhibitoren ergeben mit Antikörpern gegen Inter-alpha-trypsininhibitor einen Niederschlag.

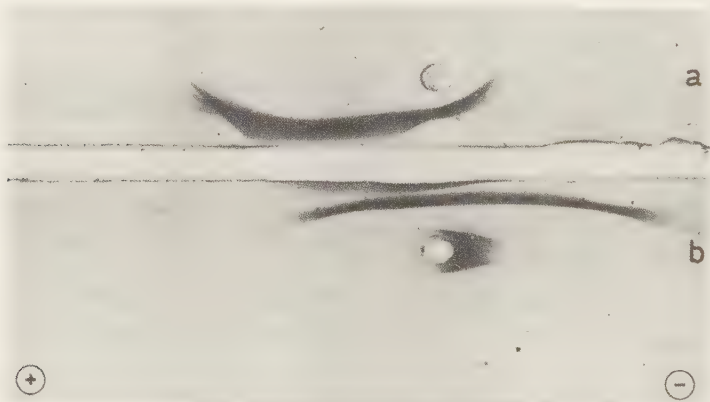


Abb 2: Immunelektrophorese von Inter-alpha-trypsininhibitor (a) (Serum) und Bronchialschleimhautinhibitor (b). Anti-inter-alpha-trypsininhibitorserum in der Rille.

Die Abb.3 zeigt die Immunelektrophorese einer Mischung aus freiem und maskiertem Inhibitor und angereichertem maskiertem Inhibitor gegen Anti-inter-alpha-trypsininhibitorserum. Offensichtlich reagiert der Schleimhautinhibitor sowohl in freier als auch in maskierter, d.h.komplexgebundener Form mit einem entsprechenden Antiserum.

Diese spezifischen immunologischen Eigenschaften des freien und maskierten Inhibitors ermöglichen es, die Proteine zu identifizieren, die mit dem Inhibitor Komplexe bilden.

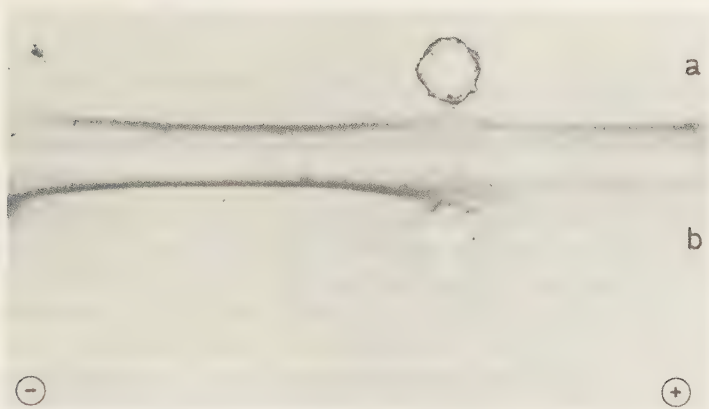


Abb.3: Immunelektrophorese einer Mischung von freiem und maskiertem Inhibitor (a) und maskiertem Inhibitor (b). Inter-alpha-trypsininhibitorserum in der Rille.

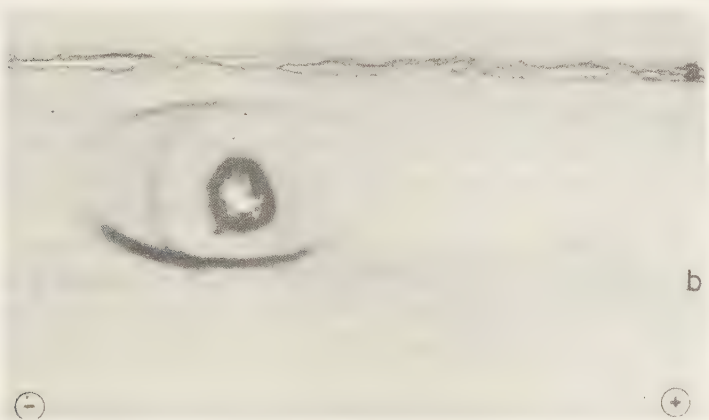


Abb.4: Immunelektrophorese mit gereinigtem, angereichertem maskiertem Bronchialschleimhautinhibitor. Antileukozytenproteinasenserum in Rille a und Antiinhibitorserum in Rille b.

Abb.4 zeigt das Ergebnis der Immunelektrophorese des angereicherten Inhibitor Komplexes mit spezifischem Antiinhibitorserum und mit Antileukozytenproteinasenserum. Mit beiden Antiseren bilden sich zwei genau symmetrische Niederschläge. Diese Niederschläge sind beweisend für die Anwesenheit von Leukozytenproteasen in der Komplexbindung mit dem Schleimhautinhibitor.

In der Abbildung 4 finden sich weiter anodenwärts noch zwei schwächere Präzipitate, die offenbar von einem weiteren in kleiner Menge vorhandenen Komplex zwischen Inhibitor und Leukozytenproteasen stammen.

Es gelang, aus Bronchialsekret einen weiteren, zweiten Inhibitor mit etwas höherem Molekulargewicht, aber gleichen immunologischen und inhibitorischen Eigenschaften wie der Hauptinhibitor, zu isolieren. Möglicherweise stammt dieses zweite Präzipitat von Komplex mit diesem Inhibitor (12). Das Vorkommen verschiedener Komplexe ist auch aufgrund der Ergebnisse von Ohlsson (22,23) zu erwarten, der für die Molekulargewichte der Leukozytenproteasen bzw.-elastasen Werte von 33 000, 34 000 und 36 500 angibt. Die Gelfiltration auf Sephadex G 100 mit angelegelter Elution des Komplexes als Doppelgipfel deutet in diese Richtung.

Die Frage, inwieweit außer den bewiesenen, in dieser Arbeit *in vivo* bewiesenen Leukozytenproteasen auch andere Proteinase, etwa Gewebs-, oder Bakterienproteinase, ebenfalls *in vivo* Komplexe mit dem Schleimhautinhibitor bilden, kann erst entschieden werden, wenn entsprechende Antiseren verfügbar sind.

Immerhin erscheint es lohnend, weiter an dem Proteinase-Inhibitorsystem zu forschen, da proteolytische Enzyme, wie eingangs erwähnt, in der Lage sind, ein Lungenemphysem zu erzeugen bzw. die Anfälligkeit des Bronchialsystems stark zu erhöhen.

Vielleicht wird es einmal möglich sein, mit Proteasen oder pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Inhibitoren in das Wechselspiel von Proteolyse und deren Hemmung gezielt einzugreifen. Man hätte dann vielleicht eine medikamentöse und kausale Therapiemöglichkeit gegenüber Infektionen, Emphysem und angeborenem Inhibitor mangelsyndrom.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. FALLOT R., LARSON R.K. :
" Obstructive lung disease and alpha-1-antitrypsin-deficiency gene heterocycosity." Science 165, 899-901 (1969)
2. FRITZ H., TRAU GOLD I., WERLE E. :
"Methoden der enzymat. Analyse" (Bergmeyer H.U., Hrsg.)
2.Aufl. Bd.I S.1221, Weinheim/Bergstr., Verlag Chemie 1970
3. HEINRICH N., KLOCKOW M., ORTH H.D. :
Hoppe-Seylers Z.physiol.Ch. 354, 1339-1346, (1973)
4. HOCHSTRASSER K., SCHORN K. ;
"Differenzierung proteolytischer Enzyme durch selektive Hemmung kombiniert mit elektrophoretischer Darstellung am Beispiel purulenter Schleimhautsekrete."
Hoppe-Seylers Z.physiol.Ch. Bd. 354, (1973)
5. HOCHSTRASSER K., REICHERT R., SCHWARZ S., WERLE E. :
"Isolierung und Charakterisierung eines Proteinaseninhibitors aus menschlichem Bronchialsekret"
Hoppe-Seylers Z.physiol.Ch.
6. HOCHSTRASSER K., HAENDLE H., REICHERT R., WERLE E. :
"Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteaseninhibitors in menschl. Nasensekret."
Z.physiol.Ch. 352 (1971),954
7. HOCHSTRASSER K., REICHERT R., SCHWARZ S., WERLE E. :
"Detection and isolation of a second acid stable inhibitor in human bronchial mucus."
Z.physiol.Ch. (1973),354
8. HOCHSTRASSER K., SCHUSTER R., REICHERT R., HEIMBURGER N. :
"Nachweis und quantitative Bestimmung von Komplexen zwischen Leukozytenproteasen und alpha-1-antitrypsin in Körpersekreten und Körperflüssigkeiten."
Z.physiol.Ch. 353, 1120-1124 (1972)

9. HOCHSTRASSER K., REICHERT R., MATZNER M., WERLE E.:
"Hemmbarkeit proteolytischer Enzyme in pathologischen Nasensekreten und von Leukozytenproteasen durch die natürlichen Proteaseninhibitoren des Nasensekrets."
Z.klin.Ch. 10, 104-107 (1972)
10. HOCHSTRASSER K., HOCHGESAND K., RASCHE B.:
" Zur Frage der gleichzeitigen proteolytischen und anti-proteolytischen Aktivität im Sputum bei obstruktiven Atemwegserkrankungen."
Respiration 31: 343-349 (1974)
11. HOCHSTRASSER K., RASCHE B., REICHERT R., HOCHGESANDT K.:
"Freie und gebundene Proteaseninhibitoren im Bronchialschleim von Patienten mit langjährigen chron.obstruktiven Lungen-erkrankungen."
Pneumologie 150, 253-259 (1974)
12. HOCHSTRASSER K., REICHERT R., SCHWARZ S., WERLE E.:
" Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial secretion."
Z.physiol.Ch. 354, 923 (1973)
13. HOCHSTRASSER K., REICHERT R., HEIMBURGER N.:
" Antigenetic relationship between the human bronchial mucus inhibitor and plasma inter-alpha-trypsininhibitor."
Z.physiol.Ch. 354, 587 (1973)
14. JANOFF A.:
" Purification of human granulocyte elastase by affinity chromatography."
Lab.Invest. 29, 458 (1973)
15. KARLSON P.:
"Lehrbuch der Biochemie", G.Thieme-Verlag Stuttgart

16. LAURELL C.B., ERIKSON S.:
"Electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum alpha-1-antitrypsin deficiency."
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 15, 132, (1973)
17. LAURELL C.B.:
"Is emphysema in alpha-1-antitrypsin-deficiency a result of autodigestion?"
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 28, 1, (1971)
18. LAZARUS G.S., BROWN R.S., DANIELS J.R., FULLMER H.M.:
Science (Wash D.C.) 159, 1483 (1973)
19. LEDDERHOSE G.:
"Über den blauen Eiter"
Deutsche Zeitschrift f.Chirurgie 28, 1888,201
20. LIEBERMANN J.:
"Heterozygous and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema".
New Engl.J.Med. 281, 279-284 (1969)
21. MAURER H.R.:
"Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese."
Verlag Walter Gruyter u.Co. Berlin (1968)
22. OHLSSON K., OHLSSON J.: "The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial charakterisation of two granulocyte collagenases."
E.J.Biochem. 36, 473 (1973)
23. OHLSSON K., OHLSSON J.:
"The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial charakterisation of granulocyte elastases."
E.J.Biochem. 42, 519 (1974)

24. RASCHE B., ULMER W.T.:
"Untersuchungen über die Zusammensetzung des Bronchial-
schleims bei chron.obstruktiver Bronchitis."
Pneumonol. 144: 10-32 (1971)
25. RASCHE B., ULMER W.T.:
"Über die Möglichkeiten der Inaktivierung der Proteasenaktivität
im Sputum bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen
durch Proteaseninhibitoren."
Res.exp.med. 158: 229-245 (1972)
26. REICHERT R., HOCHSTRASSER K., WERLE E.:
"Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors in
menschlichem Bronchialsekret."
Zeitschr. f. Laryng. Rhin. 51, 190-193 (1972)
27. REICHERT R., HOCHSTRASSER K., CONRADI G.:
"Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität des menschl.
Bronchialsekrets".
Pneumologie 147, 13-20 (1972)
28. REICHERT R., HOCHSTRASSER K., FRUHMANN G., FRITZ H., WERLE E.:
"Konzentration an niedermolekularem Proteaseninhibitor im
Bronchialschleim bei Alpha-1-antitrypsinmangel."
Pneumologie 147, 41-45 (1972)
29. RICK W.:
In: "Methoden der enzymatischen Analyse" (Bergmeyer H.U., Hrsg.)
Bd.I S. 975-980, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße
30. SCHULTZE H.E., HEREMANS J.E.:
"Molecular biology of human proteins"
pp. 817-823 (Elsevier, Amsterdam 1966)
31. STEGEMANN H.:
Z.physiol.Chem. 243, 537-578(1968)

32. VOGEL R., TRAUTSCHOLD J., WERLE E.:
"Natürliche Proteinaseinhibitoren", Thieme-Verlag Stuttgart
(1966)
33. WIESMANN E.:
"Medizinische Mikrobiologie", Thieme-Verlag, Stuttgart

Herrn Priv.- Doz. Dr. K. Hochstraßer, Leiter des Bio-chemischen Laboratoriums der Hals-,Nasen-und Ohrenklinik der Universität München, bin ich zu großem Dank verpflichtet für seine Hilfe und Führung bei der Ausführung dieser Arbeit und für das Überlassen eines Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Ebenso schulde ich Dank Frau Dr. K. Schorn für die Vermittlung der Arbeit und ihre Hilfe und freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-,Nasen- und Ohrenleiden an der Universität München, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Schließlich gilt mein Dank noch Frau S. Heindl und ganz besonders Fräulein K.Lempart für ihre freundliche Assistenz bei der Durchführung der Experimente.

LEBENS LAUF

Am 24. Januar 1951 wurde ich, Christoph Gottfried Alfred Raffelt, in Ebersbach/Sachsen, Kreis Löbau, geboren. Mit meinen Eltern, dem Diplom-Ing.f.Bauwesen Gottfried Franz Raffelt und seiner Frau Margarethe Raffelt geb.Hase floh ich 1953 in die Bundesrepublik Deutschland und lebe seither in München.

Im Herbst 1957 trat ich in die Volksschule Riemerling bei München ein.

1962 wechselte ich in das Theresiengymnasium über (in München), wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Ebenfalls 1971 immatrikulierte ich mich an der Ludwig Maximilians- Universität in München im Fach Humanmedizin. Der naturwissenschaftlichen Vorprüfung unterzog ich mich 1972, dem Physikum 1973.

Nach dem Sommersemester 1974 legte ich den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung ab, 1976 den zweiten Teil.

Das "Praktische Jahr" verbrachte ich in Chirurgie im Krankenhaus München-Schwabing, im Fach Gynäkologie an der I.Frauenklinik der Univ.München, im Fach Innere Medizin an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Univ. München.

Seit 1976 bin ich mit der Volksschullehrerin Veronika Raffelt geb.Köberlein verheiratet.

1977 legte ich den schriftlichen und mündlichen dritten Teil der ärztlichen Prüfung ab und beendete damit mein Medizinstudium.

